



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA *IN VITRO***

Trabalho submetido por  
**Gustavo Silva Araújo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**junho de 2019**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA *IN VITRO***

Trabalho submetido por  
**Gustavo Silva Araújo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Carla Ascenso**

e coorientado por  
**Prof. Doutora Cristina Manso**

**junho de 2019**



## DEDICATÓRIA

*A Deus, por ter guiado meus passos até este momento,  
Sempre me amparando e me preparando para a jornada.*

*À minha esposa. O seu apoio incondicional, altruísmo, dedicação  
e garra, me inspiraram a nunca desistir, a ultrapassar meus limites  
e me desafiar cada vez mais. Sem você, nada disso seria possível.  
Essa é uma vitória nossa. Obrigado por existir em minha vida,  
Obrigado por tudo o que fez por nós. Amo-te muito.*

*À minha família, por todo amor transmitido, mesmo à distância.  
E em especial ao meu avô, Serafim Ferreira da Silva, que resolveu  
Brilhar à distância, bem perto de Deus. Saudades eternas do meu  
maior fã, que na sua simplicidade entendia o quão alto o neto  
queria voar. A distância me protegeu, e a falta da  
despedida faz com que a sua chama  
permaneça viva dentro de nós.*



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof. Doutora Carla Ascenso e a minha coorientadora Prof. Doutora Cristina Manso, por toda a confiança depositada em mim, por todo apoio dado, pela liberdade de trabalho e por terem sempre a porta e as mentes abertas ao lidar comigo, me ajudando a completar essa etapa tão importante da minha vida. Além disso, renovaram as asas dos meus anseios académicos. Sou muito grato por tudo.

Não poderia também deixar de agradecer aos funcionários do Instituto Universitário Egas Moniz e demais professores, representados aqui pela senhora Florinda, pela senhora Sandra e pelo Prof. Doutor António Pedro Alves de Matos. Obrigado por todos os ensinamentos transmitidos, pela paciência às primeiras horas da manhã e pelos horários gentilmente cedidos ao laboratório. Este trabalho não seria possível sem todos este apoio.

Aos amigos que fiz, e que cultivei durante todos esse percurso, obrigado por toda o esforço realizado por vós para me integrar e fazer com que eu me sentisse em casa. Tenham a certeza de que vocês tornaram essa caminhada muito mais leve.

À Natália, Abner, Margery e Roberto, e meus sobrinhos Jhon e Eitor. Obrigado por sempre acreditarem em mim, por serem nosso porto seguro longe de casa. As inúmeras ligações de vídeo fizeram com que toda essa experiência fosse compartilhada. Vocês nos ajudaram a não só ultrapassar as pedras pelo caminho, mas fizeram com ela uma muralha. Muitas saudades.





## RESUMO

O estudo do osso e dos dentes nos mamíferos num contexto de biomimética da mineralização é particularmente interessante pelo elevado impacto que pode representar nas terapias e estratégias de reparação ou regeneração de tecidos humanos mineralizados. Os cristais de origem biológica, designadamente na dentina, são tipicamente formados numa matriz orgânica extracelular, constituída maioritariamente por colagénio tipo I.

Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo o de analisar o efeito da presença de agentes mineralizantes de uso clínico em restaurações e proteções pulpares ProRoot MTA<sup>TM</sup> e Recaldent<sup>TM</sup> CCP-ACP, no padrão de mineralização *in vitro*, na presença de colagénio por meio de microscopia eletrónica de varrimento e EDS

Para tanto, foram preparados três grupos experimentais, em triplicados, sendo que o Grupo A consistiu em uma solução de colagénio a 2mg/ml em HCl contendo cálcio, a qual foi adicionado uma mistura tampão a pH 7,4 com grupo controlo na ausência de colagénio. Aos demais grupos foram adicionados os agentes mineralizantes, para analisar seu comportamento com massas variáveis. Um controlo na ausência de cálcio foi adicionado para estes grupos. Os pHs das soluções foram avaliados e as amostras tratadas para visualização em microscópio eletrónico, pela técnica SEM e análise elementar por EDS.

Para a análise através de microscopia eletrónica de varrimento, todos os grupos A, B, C, na ausência de controlo negativo (colagénio) evidenciaram imagens compatíveis com padrões de mineralização, o que não se observa nos grupos de controlo negativo. Todavia, os resultados obtidos por EDS mostram uma relação Ca/P, distinta, variando entre grupos e nos grupos controlo.

O presente trabalho sugere um papel ativo do colagénio na regulação da mineralização *in vitro*, assim como o potencial mineralizante dos agentes estudados. O MTA apresentou-se ainda como um interessante reservatório de iões cálcio.

Palavras-Chave: Biomineralização, Recaldent<sup>TM</sup> CCP-ACP, ProRoot MTA, Hidroxiapatite



## ABSTRACT

The study of bone and teeth on mammals, on a mineralization biomimetic context, is particularly interesting for its impact on current regeneration therapies and strategies of human mineralized tissues. The biologically originated crystals, mainly on dentin, are typically generated on a extracellular organic scaffold, mainly constituted by Type I collagen.

Thus, the present study attempted to analyze the effect of the presence of two remineralizing agents, of clinical use, ProRoot MTA<sup>TM</sup> and Recaldent<sup>TM</sup> CCP-ACP, and their *in vitro* mineralizing patterns on the presence of collagen by Scanning electron microscopy (SEM) and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS).

Therefore, three experimental groups were made, in triplicates, with Group A consisting on a collagen solution 2mg/ml on HCl containing calcium, in which was added a buffer solution pH 7,4, with control groups in the absence of collagen. On the remaining group, the mineralizing agents were added, to analyze its behavior on with different weights. This groups had another control group, in the absence of calcium. The pHs of the solutions were evaluated and the samples received proper treatment to be analyzed by SEM and EDS.

Analyzing through SEM, all groups (A, B, C), in the absence of a negative control (collagen) presented images compatible with mineralization, which wasn't displayed by the negative control groups. Despite that, the results obtained by EDS show a Ca/P distinct proportion among the experimental and control groups.

The present work suggests an active role of collagen on regulating *in vitro* mineralization, as well as the mineralizing potential of the agents studied. MTA presented itself as an interesting calcium ions reservoir.

Keywords: Biomineralization, Recaldent<sup>TM</sup> CCP-ACP, ProRoot MTA, Hydroxyapatite



## Índice

DEDICATÓRIA.....	1
AGRADECIMENTOS .....	1
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABELAS .....	9
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	11
INTRODUÇÃO.....	11
COLAGÉNIO .....	13
FASE MINERAL .....	16
NUCLEAÇÃO NOS BURACOS DE COLAGÉNIO .....	17
CARACTERIZAÇÃO DO COLAGÉNIO MINERALIZADO .....	20
COLAGÉNIO E A ORIENTAÇÃO CRISTALOGRÁFICA DOS CRISTAIS .....	20
INTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NA MINERALIZAÇÃO DO COLAGÉNIO....	22
FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP), FOSFATO DE OCTACÁLCIO (OCP) E HIDROXIAPATIE (HAP) .....	22
AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA) .....	27
OBJETIVOS .....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
GRUPOS EXPERIMENTAIS E RESUMO DO PROCEDIMENTO .....	32
1º PASSO: PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	34
2º PASSO: INDUÇÃO DA MINERALIZAÇÃO .....	34
3º PASSO: PREPARAÇÃO DO MINERAL PARA ANÁLISE .....	35
4º PASSO: ANÁLISE DO MINERAL POR SEM .....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
GRUPO A .....	40
ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO (SEM) E ANÁLISE ELEMENTAR (EDS) ...	43
GRUPO B.....	47
ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO (SEM) E ANÁLISE ELEMENTAR (EDS) ...	49
GRUPO C.....	53

ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO (SEM) E ANÁLISE ELEMENTAR (EDS) ...	55
CONCLUSÃO.....	63
BIBLIOGRAFIA .....	65
ANEXOS	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das microfibrilhas de colagénio – adaptado de (Landis & Jaquet, 2013) copyright 2013, com permissão de utilização da Springer US e do autor (autorização em anexo).....	15
Figura 2 – Formação hierárquica do colagénio.(Landis & Jaquet, 2013) copyright 2013, com permissão de utilização da Springer US e do autor (autorização em anexo) .....	19
Figura 3 – Crescimento do cristal de hidroxiapatite – (Fujisawa et al, 2012) copyright 2012, com permissão da editora Frontiers in Bioscience (autorização em anexo) .....	21
Figura 4 – Representação esquemática do procedimento experimental realizado. ....	33
Figura 5 - Medidor eletrónico de pH Crison GLP 22, Egas Moniz CRL. O eletrodo foi calibrado com soluções tampão padrão pH 4 e pH 7.....	34
Figura 6- Centrífuga Eppendorf 5418, Egas Moniz CRL. Pot Máx: 16872.856 GForce	36
Figura 7- Microscópio eletrónico de varrimento JEOL JSM 5400, Cmicros Egas Moniz CRL.....	37
Figura 8- Amostras dispostas em uma fita de carbono, previamente à pulverização com paládio.....	37
Figura 9- Instrumento de evaporação a vácuo JEOL 400, Cmicros Egas Moniz CRL...	37
Figura 10 – Reação de mineralização <i>in vitro</i> da amostra A realizada a 25°C, no início do ensaio ( $t_0$ ), após 1 hora ( $t_1$ ), após 24 horas ( $t_{24}$ ) e no fim do ensaio ( $t_{72}$ ). 40	
Figura 11- Valores de pH dos sobrenadantes obtidos após centrifugação das soluções de amostra A.....	41
Figura 12 - Grupo A - Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água a 25°C .....	44
Figura 13 - Grupo A <sub>C</sub> (controlo) - Mineralização na ausência de colagénio e na presença de cloreto de cálcio + água a 25°C.....	46
Figura 14- Valores de pH dos sobrenadantes obtidos após centrifugação das soluções de amostra B. ....	48

Figura 15- Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP .....	49
Figura 16- Mineralização do controlo na ausência de colagénio e presença de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP .....	51
Figura 17- Mineralização do controlo na presença de colagénio e ausência de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP .....	52
Figura 18- Aspeto macroscópico das amostras C <sub>25-25</sub> .....	54
Figura 19- pHs medidos resultantes das soluções experimentais contendo MTA .....	55
Figura 20 - Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA .....	56
Figura 21- - Mineralização do controlo na ausência de colagénio e presença de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA .....	57
Figura 22 - Mineralização do controlo na presença de colagénio e ausência de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA.....	58



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário dos compostos de fosfato de cálcio com significado biológico.....	26
Tabela 2 –Grupos de estudo do presente trabalho .....	32
Tabela 3- Soluções preparadas e reagentes específicos adquiridos para o passo da mineralização .....	32
Tabela 4- Massas médias de mineral seco obtidas após as reações de mineralização realizados às diferentes temperaturas. Médias de triplicados .....	42
Tabela 5 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo A a 25°C.....	44
Tabela 6 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo A <sub>C</sub> a 25°C .....	46
Tabela 7 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo B com adição de 5% de CCP-ACP.....	50
Tabela 8 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Bc <sub>1</sub> com adição de 5% de CCP-ACP.....	51
Tabela 9 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Bc <sub>2</sub> com adição de 5% de CCP-ACP.....	52
Tabela 10 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo C com adição de 5% de MTA .....	56
Tabela 11 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Cc <sub>1</sub> com adição de 5% de MTA .....	57
Tabela 12 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Cc <sub>2</sub> com adição de 5% de MTA .....	58



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
AFM	Microscopia de força atômica
BSP	Sialoproteína óssea
CaP	Fosfato de cálcio
CSH	Silicato de cálcio hidratado
CD	Dicroísmo Circular
DMP1	Proteína da matriz de dentina 1
DPP	Fosforina da dentina
DSC	Calorímetro diferencial de varrimento
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDX	Microscopia de energia dispersiva
ESEM	Microscopia eletrônica de varrimento de ambiente
FTIR	Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatite
LVDT	Transformador linear diferencial variável
MGP	Proteína Gla-Matricial
MTA	Agregado de trióxido mineral
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NMR	Ressonância magnética nuclear
NPC	Proteínas não colagénicas
OC	Osteocalcina
OC	Osteocalcina
OCP	Fosfato octacálcio
ON	Osteonectina
OP	Osteopontina
pAsp	Ácido poliaspártico
PBS	Solução salina fosfatada
PILP	Precusores líquidos indutores de polímeros
SBF	Fluido corporal simulado
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
STF	Fluido tecidual simulado
TCP	Fosfato tricálcio
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Termogavimetria
XRD	Difração de RaiosX



## INTRODUÇÃO

O estudo do osso e dos dentes nos mamíferos num contexto de biomimética da mineralização é particularmente interessante pelo elevado impacto que pode representar nas terapias e estratégias de reparação ou regeneração de tecidos humanos mineralizados. A mineralização ocorre tipicamente em espaços extracelulares, numa matriz constituída maioritariamente por colagénio organizado em fibras altamente ordenadas que desempenham um importante papel estrutural e são consideradas críticas no processo de biomineralização. O reconhecimento da relevância da organização estrutural das malhas de colagénio na biomineralização, juntamente com as propriedades favoráveis que apresenta, que incluem elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade aceitável e baixa imunidade, justificam a atratividade do colagénio na área dos biomateriais. Por outro lado, a existência de algumas lacunas na compreensão do mecanismo de biomineralização justifica o investimento em estudos de biomineralização. (Landis et al, 2006; Gower, 2008; Qiu et al., 2015; Tomoiaia et al, 2015; Zhu et al., 2018(Gower, 2008))

### COLAGÉNIO

O colagénio é uma proteína fibrosa encontrada abundantemente na natureza, estando presente na maioria dos tecidos do corpo humano e de outros vertebrados. Devido às suas características moleculares peculiares, a molécula de colagénio apresenta uma estrutura tridimensional regular estendida e insolúvel em água, com elevada tendência a associar-se lateralmente para formar fibrilhas ou microfibras de colagénio, as quais, por sua vez, tendem a associar-se a outras proteínas em grandes complexos supramoleculares. Os complexos supramoleculares de colagénio estão associados a inúmeras e importantes funções, como a de suporte mecânico e estrutural, a de reservatório de iões e pequenas moléculas, a de reserva energética, destacando-se neste trabalho a participação nos processos de mineralização em tecidos como o osso, cartilagem, dentina e cimento. (Landis et al, 2006)

O colagénio é o principal constituinte da matriz extracelular de diversos tecidos conjuntivos com similares formulações químicas, apresentando diferenças fundamentais na sua arquitetura fibrilar. Mais de 20 tipos de colagénios humanos já foram reportados, muitos destes apresentando uma periodicidade de 67 nm dada à disposição axial das

moléculas individuais de colagénio. Destes, o colagénio tipo I é a proteína mais abundante no corpo humano, responsável pela integridade estrutural encontrada nos tecidos conjuntivos mineralizados, particularmente no osso, dentina, cemento e tendões. (Cui et al, 2007; Nudelman et al., 2010; Landis et al, 2013; Tomoaia et al, 2015)

As moléculas de colagénio são constituídas por três cadeias polipeptídicas constituídas maioritariamente por resíduos de glicina, prolina e hidroxiprolina, que em conjunto respondem por mais de 50% dos resíduos de aminoácidos presentes na sua estrutura primária. O colagénio tipo I caracteriza-se pela repetição da sequência Gly-X-Y, onde X e Y são, frequentemente, prolina e hidroxiprolina, respetivamente), a qual se designa de sequência motivo ou tripleto ( Landis et al, 2002; Cui et al., 2007; Tejeda-Montes et al., 2018). A presença constante do resíduo de aminoácido glicina, pela sua reduzida dimensão, permite o enrolamento das cadeias polipeptídicas na molécula de colagénio.

Tropocolagénio é a subunidade das moléculas de colagénio, formadas por três cadeias de polipeptídeos com aproximadamente 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Estas orientam-se numa haste helicoidal direcionada à esquerda. As unidades de tropocolagénio arranjam-se em paralelo, numa estrutura quaternária na qual os resíduos de glicina permitem associações fortes entre os peptídeos, por ligações de hidrogénio entre a cadeia lateral da glicina e o carbonilo e os grupos amida das ligações peptídicas próximas (Levine, 2011; Silver et al, 2011; Young et al., 2016).

As moléculas de colagénio tendem a associar-se entre si numa estrutura quaternária muito característica e altamente organizada, em que moléculas diferentes se alinham mantendo uma distância constante de ~40 nm entre as extremidades de moléculas diferentes (denominada de buraco de colagénio), enquanto moléculas de um alinhamento adjacente mantêm sempre um desfasamento de ~27 nm. Este espaçamento pode ser observado por microscopia eletrónica, e correspondente a aproximadamente 234 resíduos de aminoácidos. Estes buracos de colagénio são críticos para a mineralização biológica, já que parecem ser o local de eleição para a nucleação dos minerais. Os cristais aparentemente crescem e proliferam a partir desta área. Além disto, o próprio tamanho disponível nestas estruturas parece restringir o crescimento mineral. (Crane et al, 2006; Nudelman et al., 2010; Silver et al, 2011; Landis et al, 2013)

Esta conformação assumida pela molécula de colagénio tipo I admite uma especificidade de aminoácidos que possuem a capacidade de serem transladados tridimensionalmente. Assim, as moléculas vizinhas de colagénio encontram-se

organizadas em arranjos microfibrilares (seis moléculas em um modelo quasi-hexagonal de estruturação) que são escalonadas por múltiplos de 2-5 de 234 aminoácidos. Os polipeptídeos constituintes de cada molécula foram previamente definidos pela análise sequencial das cadeias alfa 1 e 2 do colagénio tipo I humanas, que podem ser obtidas do site do Instituto Nacional de Saúde (INS), e providencia um olhar mais aprimorado às relações intrafibrilares de entre os aminoácidos. (Orgel et al., 2006; Palmer et al., 2008; Landis & Jacquet, 2013)

Para cada molécula de colagénio tipo I, a identidade e posição dos aminoácidos carregados exibem diversas características interessantes, como por exemplo, o mesmo aminoácido carregado pode ser frequentemente encontrado adjacente a cada uma das cadeias polipeptídeas dos outros três colagénios ou, caso sejam diferentes, aminoácidos de cargas semelhantes ocupam posições congruentes. Ou seja, em cada molécula de colagénio tipo I, os mesmo dois ou três aminoácidos adjacentes de carga similar (ácido glutâmico/aspártico ou lisina/arginina) estão localizados em proximidade para equivalerem a dois ou três aminoácidos da mesma carga (ácido glutâmico/aspártico ou arginina/lisina). (Silver & Landis, 2011; Landis & Jacquet, 2013)

Portanto, há frequentemente aglomerações de aminoácidos carregados em cada molécula de colagénio, um resultado que leva a maiores densidades de carga em sítios intrafibrilares discretos dentro das moléculas. Estes sítios correspondem a 12 bandas diferentes ou regiões sequencialmente designadas, que coram com sais metálicos pesados nos buracos de colagénio e zonas de sobreposição presentes no colagénio tipo I. (A. Chapman, 1979; Crane et al., 2006; Landis et al., 2006; Silver & Landis, 2011)

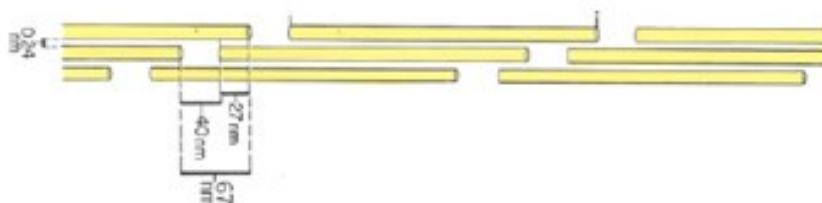


Figura 1 - Estrutura das microfibrilas de colagénio – adaptado de (Landis & Jaquet, 2013) copyright 2013, com permissão de utilização da Springer US e do autor (autorização em anexo)

Vários estudos mostraram que a fase mineral sofre nucleação preferencialmente dentro das regiões de buracos nas fibrilhas de colagénio (Figura 1) (Robinson et al, 1952; Beniash et al, 2001), nos quais a maioria dos cristais encontram-se bem organizados em arranjos paralelos, em bandas negras praticamente contínuas (Traub et al, 1989). É importante notar que enquanto o mineral precipita preferencialmente nas zonas dos buracos de colagénio, os cristais têm mostrado crescer em dimensão e eventualmente excedem o tamanho da zona de buraco de colagénio (Landis et al, 1992). Todavia, o mineral existe tanto no interior como no exterior das fibrilhas de colagénio.

#### FASE MINERAL

A mineralização do colagénio foi inicialmente considerada como uma precipitação inorgânica tradicional, tendo um crescimento cristalino originado diretamente do fluido intersticial, supersaturado em respeito às variadas fases de fosfato de cálcio (Robinson & Watson, 1952; Petruska & Hodge, 1964). A natureza da fase mineral no osso foi reconsiderada em 1960, pelos pobres padrões de difração de raios-X apresentados e pelas variações nas composições químicas obtidas de fosfatos de cálcio biológicos (Boskey, 1998; Rey et al, 2009).

Uma fase amorfa foi então proposta, além da fase cristalina da apatite, como um precursor transitório (Termine & Posner, 1966). Tal foi sustentado por (Eanes et al, 1965), que demonstraram que, sob condições meramente fisiológicas, os precipitados iniciais são amorfos e transformam-se em primeiro lugar em fosfato octacálcio (OCP) para então formarem hidroxiapatite em solução. Todavia, na ausência de evidências convincentes da formação das fases precursoras *in vivo*, levou a que, durante algum tempo, se considerasse tratarem-se de fases de ocorrência não natural. A apoiar esta ideia esteve a dificuldade em se separar convenientemente esta fase amorfa, pela sua natureza desordenada e que se funde com o próprio cristal, o que dificultou a sua análise (Johnsson et al, 1991). Estudos mais recentes, com a aplicação de técnicas mais sensíveis, confirmaram a presença *in vivo* de fases intermediárias similares a OCP, primeiro em tecidos do crânio de rato (Crane et al., 2006) e posteriormente no esmalte de ratos (Beniash et al, 2009), em ossos finos de peixe-zebra (Mahamid et al., 2008, 2010) e no crânio e ossos longos de ratos (Mahamid et al., 2010, 2011). Permitiram ainda sugerir que o mineral é depositado em *clusters* (presumivelmente ACP) pelas células presentes nas zonas de crescimento, fundindo-se com a malha de colagénio e



transformando-se em apatite. Estes resultados são consistentes com estudos em RMN que identificaram a presença de grupos fosfato protonados que fazem parte de componentes não-apatite do osso. Estas observações geraram uma mudança na maneira com que a formação mineral nos tecidos conjuntivos acontece. Todavia a origem do mineral, e a maneira com que este se infiltra nas fibrilhas de colagénio é ainda desconhecida.

#### NUCLEAÇÃO NOS BURACOS DE COLAGÉNIO

Os fatores que direcionam a nucleação na zona de buraco de colagénio permanecem vagos. Diversas investigações *in vitro* tem sido conduzidas para analisar os mecanismos relacionados com a especificidade espacial da formação de apatite no colagénio. Análises da sequência de aminoácidos e da estrutura da proteína demonstraram que o local específico na região do buraco de colagénio no qual os cristais são nucleados (Weiner et al, 1992) contém *clusters* de aminoácidos carregados (Chapman & Hardcastle, 1974; Dahl et al., 1998).

(Dahl et al., 1998; Landis & Silver, 2002; Silver & Landis, 2011), propuseram que as cadeias laterais destes aminoácidos poderiam tomar uma conformação tridimensional capaz de coordenar iões de cálcio e fosfato, providenciando assim, sítios de nucleação de apatite. Ainda, (Landis & Silver, 2002), afirmaram que a ligação preferencial dos iões de cálcio e fosfato na zona de buraco de colagénio poderia ser uma consequência da flexibilidade presente nesta região. Entretanto, a maioria dos estudos *in vitro* reportam cristais de apatite sendo nucleados uniformemente nos buracos de colagénio e nas zonas de interposição, sugerindo a existência de um mecanismo adicional com o intuito de direcionar a formação de apatite a locais específicos (Olszta et al., 2007; Beniash et al., 2009; Nudelman et al., 2010).

Uma outra hipótese considera que as regiões de buraco de colagénio das fibrilhas adjacentes criariam canais para providenciar espaço, permitindo assim a formação mineral (Landis et al, 1992; Yamauchi et al, 1989). Embora a constrição do espaço possa realmente exercer um papel importante, o fato é que a nucleação *in vitro* no colagénio foi observada tanto no buraco de colagénio quanto na zona de interposição, sugerindo que a disponibilidade espacial não limitaria o crescimento dos cristais (Olszta et al., 2007; Beniash et al., 2009; Nudelman et al., 2010). Na realidade

os cristais são capazes de empurrar as fibrilhas de colagénio enquanto crescem, permitindo assim a formação mineral na zona de interposição.

Os autores (Weiner & Traub, 1992; Dahl et al., 1998) supuseram ainda que as proteínas não colagénicas poderiam direcionar a formação de apatite na região do buraco de colagénio. Diversos trabalhos sobre as interações entre as NPCs e o colagénio demonstraram que a fosforina da dentina (DPP), proteína da matriz da dentina 1 (DMP1) e sialoproteína óssea (BSP) possuem a capacidade de se ligarem aos buracos de colagénio (Weiner & Traub, 1992; He & George, 2004). A DPP, em particular, liga-se preferencialmente ao local no qual a nucleação dos cristais de apatite pode ser observada (Weiner & Traub, 1992). Em estudos de mineralização *in vitro* realizados por (Beniash et al., 2011), a DPP não induziu preferencialmente a formação de apatite no buraco de colagénio.

Pouco se sabe a respeito dos detalhes de como as moléculas orgânicas por si só mudam no estágio inicial de biomineralização. A razão para isto é que a mineralização no seu estágio inicial é relativamente rápida e as reações relativas de interface são difíceis de serem observadas. Investigações *in situ* da maneira com a qual o processo de mineralização biológica evolui na interface orgânica/mineral, a partir do seu estágio inicial, revelam alguns dos mecanismos de reação à nível molecular (Cui et al, 2008). Enquanto esta matriz estruturada descrita acima providencia a base para uma associação do mineral com o colagénio tipo I, há relatos na literatura de que a mineralização ocorre tanto internamente (deposição intrafibrilhar) quanto externamente (deposição interfibrilhar) às moléculas de colagénio tipo I por processos aparentemente distintos um do outro. Ainda, foi também demonstrado que este mineral é composto de cristais de apatite carbonados e finos, em forma de *platelets*, alinhados geralmente paralelos uns com os outros dentro da estrutura de colagénio tipo I com seus eixos c orientados paralelamente ao longo eixo do colagénio com o qual se associam (Landis et al, 2006, 2013; Weiner et al, 1992).

Sendo assim, é sugerido que a estequiometria polipeptídica do colagénio tipo I é fundamental para os eventos iniciais da deposição mineral nos espaços intrafibrilhares da molécula. Neste sentido, as cadeias de aminoácidos laterais carregadas do polipeptídeo nos arredores dos buracos de colagénio tipo I e zonas de sobreposição são consideradas como zonas de ligação adjuvantes para os iões de cálcio e fosfato encontrados nos fluidos supersaturados teciduais circundantes (Landis et al, 2013).

A combinação de íons cálcio e fosfato resultante encontra-se em íntima associação, constituindo um centro para a nucleação de cristais minerais nos buracos de colagénio e zonas de sobreposição intrafibrilares (Figura 2). O colagénio tipo I parece então atuar como uma matriz para a nucleação dos cristais, e o faz independentemente das demais moléculas (não colagénicas) presentes nos tecidos. Entretanto, embora essa última conclusão possa ser apropriada para a mineralização intrafibrilhar, a mesma conclusão não pode ser necessariamente aplicada à formação mineral entre as fibras de colagénio (mineralização interfibrilhar), e demais formações hierárquicas estruturais da proteína. Nestes casos, os meios de deposição mineral que circundam o colagénio são ainda incertos e requerem uma maior clarificação, possivelmente com o envolvimento das proteínas não colagénicas (NCPs) e demais moléculas acessórias presentes no meio (Silver & Landis et al, 2011; Landis et al, 2013).

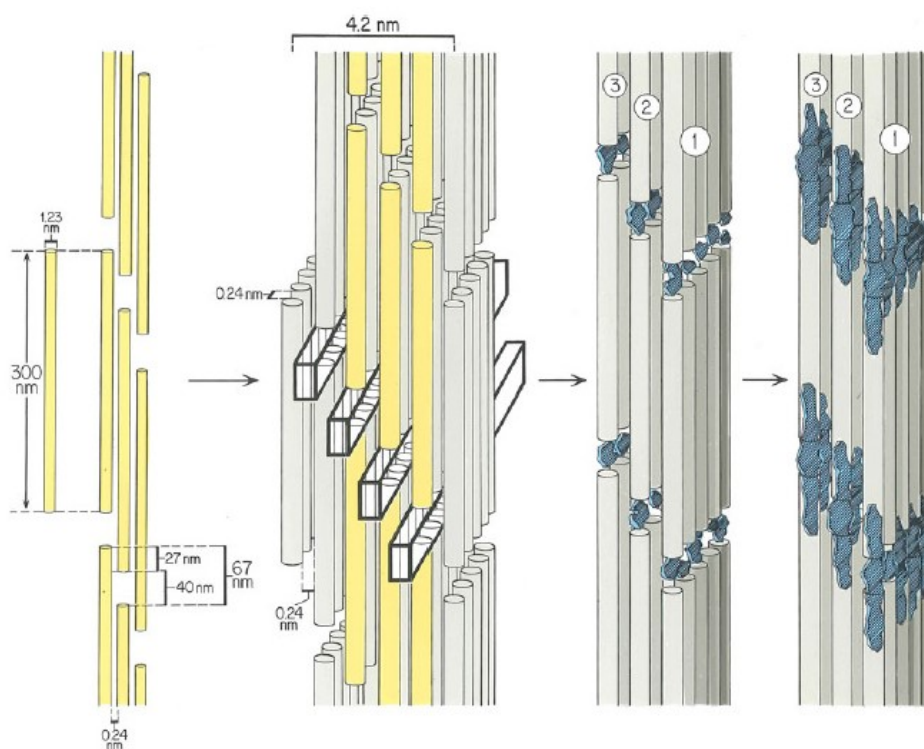


Figura 2 – Formação hierárquica do colagénio.(Landis & Jaquet, 2013) copyright 2013, com permissão de utilização da Springer US e do autor (autorização em anexo)

Enquanto a regulação e controle da mineralização interfibrilhar do colagénio é conjectural nos espaços extracelulares dos vertebrados, outros aspetos da interação colagénio-mineral carecem de um maior conhecimento e entendimento. Ilustrando este facto, há pouca introspeção na ocorrência do alinhamento paralelo dos cristais recém-

formados e na orientação estrita dos seus eixos *c*-cristalinos ao longo do eixo principal do colagénio. Há também incompleta evidência documentando a progressão do crescimento e desenvolvimento destes cristais após a sua nucleação inicial em associação com o colagénio tipo I e há poucos dados relevantes referentes à deposição mineral intrafibrilar no espaço longitudinal estreito existente entre as moléculas de colagénio tipo I (Landis & Jacquet, 2013).

#### CARACTERIZAÇÃO DO COLAGÉNIO MINERALIZADO

A caracterização do colagénio mineralizado pode ser conseguida por meio de variadas técnicas, sendo que a maior parte dos estudos utilizam a microscopia (SEM, TEM, AFM e fluorescência) para visualizar a fibra de colagénio mineralizada ou espectroscopia (Raio-X, FTIR, Raman, Imagem de Ultrassom de Espectro de Alta Resolução) para determinar o conteúdo químico das amostras e testes *in vitro* em culturas celulares para verificar a interação do novo material com o meio biológico, e mais alguns outros como: determinar as propriedades mecânicas, comportamento térmico (DSC, TGA), capacidade de absorção e algumas simulações moleculares das interações que podem ocorrer entre o colagénio e os outros componentes (especialmente hidroxiapatite) (Tomoaia & Pasca, 2015).

Por análise de difração de eletrões, pode verificar-se o alinhamento já mencionado dos eixos *c*-cristalográficos na direção dos longos eixos do colagénio com os quais se associam e, a partir de tomografia eletrónica de alta voltagem, constatar a orientação paralela (uns aos outros dentro de ~15-20°) na qual muitos cristais podem ser nucleados de forma independente e em proximidade uns com os outros na mesma região canalizada. Os cristais estão, desta forma, alinhados e orientados tanto com o colagénio quanto uns com os outros enquanto crescem e desenvolvem-se de uma maneira intrafibrilar (Landis & Jacquet et al, 1992, 2013).

#### COLAGÉNIO E A ORIENTAÇÃO CRISTALOGRÁFICA DOS CRISTAIS

A regulamentação da orientação cristalográfica dos cristais de apatite no osso e na dentina é também uma questão importante. Acredita-se que as características estereoquímicas do colagénio são fundamentais no direcionamento das ligações iónicas,

nucleação de apatite, e no tamanho, formato, orientação e alinhamento dos cristais (Landis et al., 2006; Silver & Landis, 2011).

Os modelos de mineralização *in vitro* descritos acima sugerem que esta hipótese é correta, já que os compostos usados como agentes de mineralização provavelmente não geram uma relação epitaxial com a apatite (Olszta et al., 2007). A mineralização do colagénio pode ser conseguida utilizando a fetuína em solução, mesmo sendo uma proteína grande demais para se infiltrar na fibrilha. Desta forma, somente o colagénio é responsável por induzir uma nucleação orientada (Nudelman et al., 2010). Por outro lado, uma nucleação orientada da apatite e a formação de cristais bem organizados foram observadas quando as fibrilhas se encontravam bem estruturadas (Figura 3). Fibrilhas desorganizadas geralmente contêm somente cristais dispostos aleatoriamente, o que indica falta de estrutura para a formação mineral (Nudelman et al., 2011, 2013). Apesar disto, deve-se considerar que todos estes estudos foram realizados *in vitro*, utilizando compostos sintéticos para substituir as proteínas envolvidas diretamente na mineralização. Nos tecidos biológicos, no qual todas as NCPs são encontradas, não pode ser descartada a hipótese de que estas proteínas têm um papel importante na indução de uma nucleação orientada, assim como no alinhamento dos cristais de apatite, relacionados com o colagénio. A DMP1, por exemplo, tem demonstrado *in vitro* orientar cristais de apatite tanto intra quanto extrafibrilhar (Beniash et al., 2011).

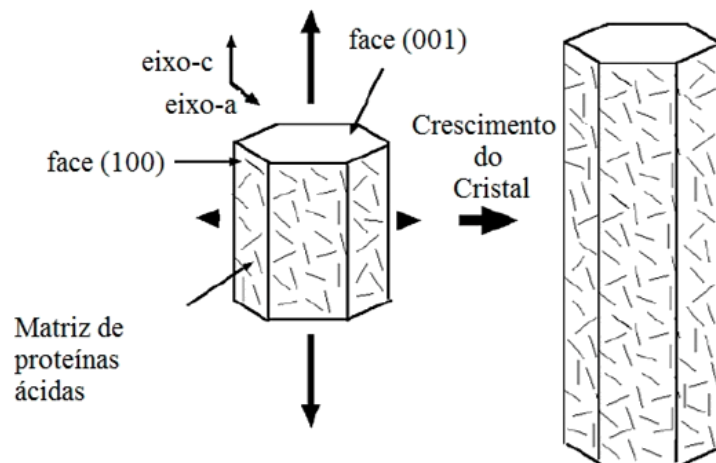


Figura 3 – Crescimento do cristal de hidroxiapatite – (Fujisawa et al, 2012) copyright 2012, com permissão da editora Frontiers in Bioscience (autorização em anexo)

## INTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NA MINERALIZAÇÃO DO COLAGÉNIO

A mesma estrutura básica é encontrada nos tecidos osteóides: colagénio, cristais de HAP (*platelets*), com eixos  $c [0\ 0\ 1]$  alinhados paralelamente ao longo eixo das fibrilhas, estruturadas previamente por *self-assembly*. Os cristais de HAP são nucleados nos buracos de colagénio, mas crescem além deles e são armazenados no espaço existente entre as moléculas de tropocolagénio, originando os nanocompósitos orgânicos-inorgânicos (Tomoaia et al, 2015).

Como se sabe, a fibrilogénese ocorre previamente à mineralização no tecido ósseo natural. Entretanto, a sequência correta entre o *self-assembly* do colagénio e a nucleação dos cristais minerais ainda é discutida. A fibrilogénese pode ser realizada em até 3 etapas *in vivo*. O processo foi proposto inicialmente pela síntese cadeia polipeptídica alfa em ambiente intracelular, com posterior conversão em procolagénio (depois de clivagem enzima-específica ao nível seu peptídeo terminal), culminando com a sua transferência para o meio extracelular, rico em iões de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  (Niu et al, 2017).

Entretanto, as vesículas da matriz não são o único local de nucleação da mineralização. Numerosos estudos *in vitro* indicam uma grande diversidade de proteínas de matriz que possuem atividade indutora de nucleação, assim como controlam o crescimento e a evolução destes cristais (Gower, 2008; Palmer et al, 2008).

## FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP), FOSFATO DE OCTACÁLCIO (OCP) E HIDROXIAPATITE (HAP)

Denomina-se como fosfato de Cálcio Amorfo (ACP) a fase sólida inicial que precipita de uma solução supersaturada de fosfato de cálcio, convertendo-se rapidamente numa fase cristalina estável como o fosfato de octacálcio (OCP) ou produtos de apatite (Zhao et al, 2012).

O ACP é ímpar entre os fosfatos de cálcio. Sua forma morfológica, modelos estruturais e padrões de difração de raio-x são típicos de substâncias não cristalinas com periodicidade pequenas e regulares. Demonstrou-se que o ACP possui melhor osseointegrabilidade *in vivo* que a hidroxiapatite (HAP) e melhor biodegradabilidade que

o fosfato tricálcio (TCP). Além disso, não é citotóxico e possui um bom nível de bioatividade. Estas excelentes biocaracterísticas explicam o motivo pelo qual o ACP possui excelente potencial para aplicações mais abrangentes em biologia oral, dentisteria, biomecânicas ortopédicas, biomateriais e medicina em geral (Zhao et al, 2012).

As partículas de fosfato de cálcio amorfo apresentam-se em média como esferas de 300-1000 Å ao microscópio eletrônico, sendo que o seu tamanho exato varia de acordo com as condições de preparação, consistindo de uma organização aleatória de aglomerados iônicos de 9,5 Å de diâmetro, dimensões estas consistentes com o composto químico ortofosfato de cálcio ( $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ ). Demonstrou-se que uma percentagem de 15-20% de água, encontrada no fosfato de cálcio amorfo sintético, não se encontra dentro dos aglomerados individuais de  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ , mas sim no interstício entre as moléculas. As suas partículas agregadas dissolvem-se rapidamente e cristalizam a apatite, uma fase mais estável termodinamicamente, pois o efeito da ligação com a água não é forte o bastante para evitar a cristalização do composto ( Boskey, 1998).

Aceita-se atualmente que as reações de precipitação (tanto *in vivo* quanto *in vitro*) em pHs fisiológicos e supersaturações suficientes de cálcio (Ca) e fosfato (P) resultam na formação inicial de fosfato de cálcio amorfo com proporção molar de Ca/P de aproximadamente 1.5, na faixa de 1.34 – 1.50 com alterações de pH e 1.50 – 1.67 quando diferentes carbonatos são adicionados à solução. Todavia Wuthier e colaboradores reportaram que o ACP, com proporções molares de  $\text{Ca}/\text{PO}_4$  tao baixas quanto 1.15, precipitam em pHs mais ácidos (Feenstra & De Bruyn, 1979; Wuthier et al., 1985; Zhao et al., 2012).

A sua estrutura desordenada implica numa maior reatividade do ACP com o fluido corporal, causando substancialmente uma dissolução rápida e posterior reprecipitação em apatite. Assim, o ACP tem provado possuir uma melhor condutividade *in vivo* que a hidroxiapate e melhor biodegradação que o fosfato de tricálcio. O precipitado ACP, com tamanhos menores, constitui uma fase altamente instável e hidrolisa-se praticamente de forma instantânea em fases mais estáveis. Na presença de outros iões e sob condições propícias *in vivo*, o ACP pode persistir por períodos mais apreciáveis dado à estabilização cinética. Embora o mecanismo exato de estabilização do fosfato de cálcio não esteja completamente esclarecido, sabe-se que a presença de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ , carbonato, pirofosfato, difosfonato, metabólitos fosforilados, ou

nucleotídeos, em quantidades suficientes vão prevenir a transformação do fosfato de cálcio amorfo em hidroxiapatite (Dorozhkin, 2010).

O ACP exerce um papel especial como precursor de bioapatite e como fase transitória na biomineralização. Em soluções, é convertido rapidamente a fases mais estáveis cristalinas como o fosfato de octacálcio ou produtos de apatite. Uma estratégia de biomineralização que tem recebido bastante atenção nos anos recentes é a mineralização via fases precursoras transitórias. Estas têm sido detetadas em sistemas biominerais de diferentes filos no reino animal. Uma fase mineral desorganizada é precursora da hidroxiapatite carbonada cristalina. As partículas minerais amorfas cristalinas inicialmente extraídas transformam-se numa fase mineral cristalina com o tempo, e a proporção de mineral cristalizado aumenta durante a maturação tecidual. A fase transitória do ACP pode concebivelmente ser depositada diretamente nas lacunas entre as fibras de colagénio, mas pode também ser entregue como uma partícula extra fibrillar. Isto é consistente com estudos de mineralização de colagénio via fase precursora de ACP *in vitro* produzindo cristais de apatite carbonatados intrafibrilares (Mahamid et al., 2008; Beniash et al., 2009; Wang & Nancollas, 2010).

Este papel precursor pode ser verificado por estudos *in vitro*, que mostraram que a formação de cristais de hidroxiapatite por associação de iões cálcio e iões fosfato não ocorre diretamente, sendo precedida por uma forma transiente cineticamente mais acessível, o fosfato de cálcio amorfo (ACP). O ACP que evolui posteriormente para fosfato de octacálcio (OCP) e só então origina o cristal de hidroxiapatite (HA) (Zhao et al., 2012). O termo apatite indica uma estrutura mineral com a fórmula química  $A_4B_6(MO_4)_6X_2$ , onde A e B são ambos cálcio, em vários tecidos biológicos,  $MO_4$  é um grupo fosfato e X um ião hidróxido.

Estudos sobre a preparação da hidroxiapatite *in vitro* demonstraram que a fase sólida inicial que precipita de uma solução de fosfato de cálcio depende do grau da supersaturação. Um precursor não cristalino ACP similar a  $Ca_9(PO_4)_6$  em composição, aparece sob condições de supersaturação elevada. Este precursor ACP, a não ser que seja estabilizado de alguma maneira, transforma-se em fases mais estáveis termodinamicamente de fosfato de cálcio, ou leva a um processo de cristalização mediado por solução, mas autocatalítico (Feenstra et al, 1979; Beniash et al., 2011; Zhao et al., 2012).

Por outro lado, o primeiro sólido a formar em soluções supersaturadas mais baixas é a hidroxiapatite, com proporções de Ca/P de 1.67 obtidas sem fases precursoras



- portanto o ACP não pode ser considerado como um precursor obrigatório para apatite, porém pode ser usado em soluções diluídas para formar apatite sem fases transitórias. O valor de pH também afeta a fase sólida inicial na precipitação de íons cálcio e fosfato. OCP é a fase cristalina formada inicialmente quando o pH da reação é menor que 9.25, enquanto que a apatite é formada preferencialmente a pHs mais elevados. Como se sabe, em pH neutro e moderada supersaturação, ACP é normalmente o primeiro depósito a se formar *in vitro*. O mecanismo de transformação de ACP em apatite em pH fisiológico tem sido descrito como o seguinte: Dissolução do ACP, reprecipitação de sólido em OCP *transitória* por nucleação, hidrólise da fase *transitória* OCP em uma apatite termodinamicamente mais estável por reação topotática, um processo que normalmente leva mais de 10 horas (Nagano et al, 1996; Tadic et al, 2002).

Inicialmente, a apatite biológica é formada por um cristal de tamanho reduzido, que gera uma maior área de superfície, permitindo assim uma absorção adicional de íons e moléculas na superfície da mesma. A apatite biogénica possui ainda substituições significativas de carbonatos, deficiências de  $\text{OH}^-$  e imperfeições na sua malha cristalina. Um exemplo disto são os íons de  $\text{F}^-$  prontamente incorporados na malha da HAP, formando fluoroapatite, uma fase menos solúvel de fosfato de cálcio em comparação à HAP. Finalmente, o mineral biológico tende a atingir uma maior cristalinidade e uma estrutura mais organizada numa escala de dias ou meses ao contrário de levar anos como em seu análogo geológico (Verdelis et al., 2007).

No início dos anos 1900 e com a aplicação de técnicas de difração de raios-X estabeleceu-se que os tecidos osteóides possuem cristais similares à HAP geológica, de fórmula unitária  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , com uma proporção Ca/P de 1,67 (Young et al., 2016). Contudo, estudos recentes demonstraram que a proporção molar de Ca/P em tecidos mineralizados tais como o osso e a dentina podem variar de forma significativa deste valor ideal devido a um maior número de substituições e lacunas presentes na estrutura. (Boskey, 2007; Qiu et al., 2015).

A existência de cristais de fosfato de cálcio alternativos da HAP ocorrem pelo papel do osso como reservatório para manter a homeostase dos íons de cálcio, magnésio e fosfato. A HAP carbonatada,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ , conhecida como hidroxilo-apatite, é o mineral fosfatado mais abundante nos mamíferos, particularmente nos ossos e dentes. A substituição do carbonato por hidróxido é conhecida como substituição do tipo A, e as substituições carbonato-fosfato são conhecidas como de tipo B, podendo ser distinguidas por espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier

(FTIR). A HAP carbonatada no esmalte e dentina exibem menos imperfeições e assemelham-se à proporção estequiométrica, já que os dentes não estão tipicamente envolvidos na manutenção da homeostase. (Olszta et al., 2007; Liam et al., 2009)

Diante de todos estes compostos constituídos por fosfato de cálcio, a Tabela 1 apresenta um sumário dos compostos mais comuns, com a proporção Ca/P e fórmula estrutural:

Tabela 1 - Sumário dos compostos de fosfato de cálcio com significado biológico

Composto	Acrônimo	Fórmula	Ca/P
Fosfato de monocalcário	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Fosfato de monocalcário	MCPA ou MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
Fosfato dicálcio dihidratado	DCPD	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.0
Fosfato dicálcio anidro	DCPA, DCP	$\text{CaHPO}_4$	1.0
Fosfato Octacálcio	OCP	$\text{Ca}_8(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
$\alpha$ -Fosfato tricálcio	$\alpha$ -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
$\beta$ -Fosfato tricálcio	$\beta$ -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , $n = 3 - 4.5$ ; 15% - 20% $\text{H}_2\text{O}$	1.2 – 2.2
Hidroxiapatite deficiente de cálcio	CDHA, Ca-def HA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	1.5 – 1.67
Hidroxiapatite	HA, Hap, OHAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Fluoroapatite	FA ou FAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1.67
Oxiapatite	AO, OAP, OXA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^\circ$	1.67
Fosfato de tetracálcio	TTCP, TetCP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2^\circ$	2.0

Baseado nas análises de tempos de indução dos precipitados e na estrutura da fase sólida resultante, (Feenstra et al, 1979) propuseram que o OCP atua como uma fase intermediária na conversão de ACP à apatite. Sendo o OCP e os cristais de apatite geralmente encontrados em associação com as esferas de ACP, é possível que este haja como uma matriz para o crescimento destas fases cristalinas. Entretanto, esta formação parece acontecer mais pelo consumo de íons amplamente fornecidos pelo meio do que diretamente pela hidrólise de material amorfo sólido.

Já em pH fisiológico, as análises de cinética de conversão indicam dois processos distintos: o primeiro processo consome ácido com a conversão de ACP ao

intermediário OCP, e o segundo consome base com a conversão do intermediário OCP a apatite, ou, possivelmente, para a conversão direta de ACP a apatite. Hoje em dia propõe-se que uma HAP estequiométrica é formada quando não há OCP intermediário e que uma HAP não estequiométrica é formada quando a fase intermediária se encontra envolvida no processo (Bruyn, 1981).

Uma literatura crescente propõe que uma nucleação homogênea é a base para a formação do cristal na diversidade dos sistemas de mineralização biológica. Neste sentido, trabalhos recentes demonstraram *clusters* pré-nucleadores de grupos estáveis de íons cálcio e fosfato em soluções como o fluido corporal estimulado (SBF). Na presença de uma superfície nucleadora, estes *clusters* iniciais de íons, resultantes de reações homogêneas foram transformados numa fase de fosfato de cálcio amorfo (APC) como um precursor de uma apatite mais cristalizada no sistema. O contexto de *clusters* pré-nucleação a mediar a formação mineral é potencialmente significativo. A sua possível relação com análogos poliméricos como o ácido poliaspártico como visto em trabalhos relacionados com precursores líquidos indutores de polímeros (PILPs) ou moléculas coadjuvantes potenciais pode providenciar uma nova abordagem e uma nova era nos mecanismos tanto de deposição mineral quanto de inibição em tecidos vertebrados (Nudelman et al., 2010; Landis et al., 2013).

#### AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA)

Os cimentos de silicato de cálcio são cimentos hidráulicos compostos principalmente de silicatos de di e tricálcio, aluminato de tricálcio e gesso. Quando hidratados, estes componente hidrofílicos passam por uma série de reações físico-químicas que originam um gel nanoporoso de silicato de cálcio hidratado (“CSH”), uma fração solúvel de hidróxido de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$  (ou portlandite), e compostos de aluminato de cálcio hidratados (Camilleri, 2008). Possuem a propriedade importante de solidificar em ambientes húmidos, como água, sangue e outros fluidos, e desta forma são úteis em medicina dentária.

O agregado de trióxido mineral (MTA), principal representante dos cimentos de silicato de cálcio é basicamente uma mistura de três ingredientes em forma de pó: Cimento de Portland (75%), óxido de bismuto (20%) e gesso (5%). Sua composição conta ainda com alguns traços de óxido de sílica, monóxido de cálcio, monóxido de magnésio, sulfato de potássio e de sódio. O cimento de Portland, seu maior constituinte,

é uma mistura de silicato de cálcio, silicato de tricálcio, tricálcio aluminato, tetracálcio aluminoferroso. O MTA é preparado como uma mistura pó-líquido e é utilizado como uma pasta, gradualmente solidificando em ambiente oral (Sarkar et al, 2005).

Desde a sua introdução como material de preenchimento de canais em 1993, a utilização do MTA foi expandida para tratamentos como capeamento direto, regenerações de raízes e em perfurações de furca, assim como em cirurgias de apicectomia e para redução de hipersensibilidade dentinária. Sua excelente biocompatibilidade pode ser evidenciada pelos diversos processos biológicos favoravelmente induzidos pelo MTA, tais como toxicidade tecidual e irritação pulpar discretas, inflamação periapical mínima, ausência de mutações génicas, promoção de aderência e crescimento celular e de níveis elevados de fosfatase alcalina e osteocalcina, produção de interleucinas, aderência ao ligamento periodontal, crescimento do cimento e formação de pontes de dentina (Sarkar et al, 2005; Gandolfi et al, 2008).

Sarkar et al., 2005, imergiram MTA numa solução tampão fosfatada por diferentes períodos (3 dias e 2 semanas) e foram assim capazes de demonstrar formação de apatite por meio de análise de XRD do precipitado originado desta solução. Em 2006, foi reportada a formação de apatite em MTA branco e MTA cinza, imersos 40 dias numa Solução tampão salina contendo fosfato (PBS) livre de cálcio, num estudo pioneiro da habilidade de formação de apatite do Pro Root MTA nos seus estágios iniciais de hidratação quanto a cinética da formação mineral (Giovanna et al., 2010).

Foi subsequentemente provado que formas diferentes de apatite são depositadas em cimentos de silicato de cálcio modificados (Gandolfi et al., 2008; Giovanna et al., 2010), cimento de Portland branco (Coleman et al., 2007), cimentos de silicato-tricálcio e cimentos de silicato dicálcio experimentais. Em particular, a bioatividade do cimento de Portland branco previamente envelhecido por 28 dias e então imerso em SBF tem sido demonstrada, por meio de FTIR e SEM-EDX (Coleman et al., 2007). A habilidade formadora de apatite de um cimento de silicato dicálcio em solução de Hank ou após um período de 1-30 dias de imersão em solução kokubo foi demonstrada utilizando-se técnicas de XRD, FTIR e SEM-EDX (Giovanna et al., 2010).

A formação de uma camada de apatite é acionada pela liberação de cálcio das partículas de silicato de cálcio, dissolução de portlandite e pela formação de grupos de Si-OH na superfície do cimento (Coleman et al., 2007). Já foi provado que os grupos de Si-OH atuam como agentes de catálise providenciando sítios favoráveis para a nucleação da HA (Giovanna et al., 2010); a superfície de HA dá suporte à diferenciação

osteoblástica, que leva à ligação com o osso (Bensted, 1976). Ainda, substratos hidrofílicos, dados à presença de grupos OH na superfície, facilitam a conexão com uma camada de apatite nucleada (Tay et al., 2007). Há ainda relatos na literatura de que os silicatos aceleram e melhoram a reprecipitação da apatite biológica atuando como sítio de nucleação para a reprecipitação desta; uma formação cristalina significativamente mais produtiva foi observada na substituição da sílica por hidroxiapatite do que quando a HA é imersa em SBF (Cutajar et al., 2011).

A concentração de grupos de Si-OH na superfície dos cimentos de silicato de cálcio imersos em DPBS é provavelmente maior durante as primeiras horas da reação de presa. Na verdade, análises de SEM, ESEM, micro-Raman e ATR-FTIR confirmaram que o cimento passa por modificações de superfície durante a imersão em solução (Giovanna et al., 2010).

A maturação do cimento em solução atua de forma crítica na mudança de morfologia de superfície do mesmo, no tamanho dos cristais precipitados, na profundidade dos poros, e na composição química de superfície. Após 5h, a superfície das amostras é composta majoritariamente de “portlandite”, “etringite” e gel de Si-OH; ocasionalmente o fosfato de cálcio pode ser detetado. Aumentando o tempo de envelhecimento, o portlandite, etringite gel de Si-OH decrescem, enquanto depósitos mais volumosos de grânulos de apatite e esferas nanométricas podem observadas na superfície. No exterior das amostras envelhecidas, a sílica encontra-se completamente ausente, enquanto que o fosfato prevalece (a Si desaparece provavelmente dada a nucleação de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  e a formação de uma camada de Ca-P, enquanto a Si é depurada do sistema). É provável que os grupos de Si-OH dos cimentos inalterados providenciem sítios para a nucleação de fosfato de cálcio e catalisem a precipitação de sólidos de Ca-P, onde o cálcio é fornecido pela dissolução de portlandite e o fosfato pela solução (Giovanna et al., 2010; Elnaghy et al., 2015).

Estudos utilizando análises por ESEM/EDX, demonstraram que estes depósitos de apatite e fosfato de cálcio formam sulcos profundos na interface material-dentina, criando uma superfície irregular. Eventualmente, com a união de partículas carregadas a essa superfície, um local propício para nucleação é gerado desta forma atraindo e absorvendo cada vez mais, grandes quantidades de íons de cálcio (libertado pelo cimento) e fosfato (da solução), desta maneira expandindo a área ocupada pelas partículas de apatite. Em períodos de imersão em soluções de 14-28 dias, (Giovanna et

al., 2010) encontraram, na superfície de todos os cimentos, uma cobertura espessa de grânulos de apatite esferoidais.

Histologicamente, esta ligação presente na interface tem sido descrita como ponte de dentina, matriz osteotípica, osteodentina e dentina (Damidot et al., 1994; Forbes et al., 1998; Formosa et al., 2012). Devida às suas características birrefringentes sob luz polarizada, esta estrutura pode ser sugerida como calcita, um composto de carbonato de cálcio (Forbes et al., 1998).

O fluido tecidual é altamente rico em iões fosfato; seu conteúdo de carbonatos é relativamente baixo. Em tal meio, a formação de HA é quimicamente mais favorável que a calcita (Niu et al., 2014). Estudos de (Nonat et al., 1994) demonstraram o crescimento de depósitos cristalinos na superfície de MTA e uma zona de estruturas cristalinas junto à interface polpa-MTA. Uma das estruturas cristalinas analisadas continha Ca e P, sugerindo formação de HA. Em outro estudo conduzido por (Cao et al., 2015), pontes de dentina enriquecidas com Ca e P foram identificadas em polpas de cães após capeamento pulpar e pulpotomia com MTA. Estas observações, juntamente com os nossos dados e a informação sobre o processo de calcificação biológica leva a assumir que o produto da reação de MTA com o ambiente oral seja não calcita, mas HA.

A HA por si e os demais materiais contendo cálcio exibem excelente biocompatibilidade, manifestada como mínima toxicidade tecidual e reação de corpo estranho, osteoindução e osteogénese (LeGeros, 1991; Yuan et al., 2000). Esta característica é atribuída à sua capacidade de libertar iões de cálcio e fosfato, fatores críticos no metabolismo ósseo. Neste contexto, o facto de que variados materiais como hidróxido de cálcio, cimentos de fosfato de cálcio, cimentos de hidroxiapatite e cimentos de Portland apresentem propriedades biológicas favoráveis similares ao MTA não surpreende. Parece que a discussão precedente de que esta similaridade reside no seu meio de ação baseia-se na característica comum que todos possuem: a sua propensão a libertar cálcio e a habilidade de formar HA. (Yuan et al., 2000)

Foi concluído desta maneira que o MTA não é um material inerte num ambiente oral simulado; é bioativo. Em contato com STF, dissolve-se, libertando desta forma todos os seus componentes catiónicos maioritários e desencadeia a precipitação de HA na sua superfície e no fluido circundante. Parece ligar-se quimicamente à dentina quando em contato com esta, possivelmente via uma reação de difusão controlada entre a sua superfície contendo apatite e a própria dentina. O sucesso clínico do MTA, em

termos de selamento, biocompatibilidade e atividade formadora de dentina encontra-se enraizada nas reações físico-químicas ( Sarkar et al., 2005).

#### OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da presença de agentes mineralizantes de uso clínico em restaurações e proteções pulpare ProRoot MTA™ e Recaldent™ CCP-ACP, no padrão de mineralização *in vitro*, na presença de colagénio por meio de microscopia eletrónica de varrimento e EDS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### GRUPOS EXPERIMENTAIS E RESUMO DO PROCEDIMENTO

O presente trabalho experimental envolveu a indução da biomineralização *in vitro* em três situações distintas (tabela 2) e sua comparação por análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento. Para tal, utilizou-se o método descrito por Cui et al., 2008, com algumas alterações, nomeadamente no que diz respeito à temperatura do passo de mineralização (analisou-se a mineralização às temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C). Adicionalmente, houve a necessidade de estimar a quantidade de agente mineralizante a usar, tendo-se optado por testar várias percentagens do mesmo (5%, 10%, 25% e 50%), calculadas com base no teor de cálcio presente nas formulações utilizadas, de acordo com as indicações do fabricante.

Tabela 2 – Grupos de estudo do presente trabalho

Grupo A	solução ácida de colagénio + CaCl <sub>2</sub> + tampão salino de neutralização
Grupo Ac	solução de ácido clorídrico HCl + CaCl <sub>2</sub> + tampão salino de neutralização
Grupo B	solução ácida de colagénio + CaCl <sub>2</sub> + tampão salino de neutralização + CPP-ACP
Grupo BB <sub>1</sub>	água bidestilada dH <sub>2</sub> O + CaCl <sub>2</sub> + tampão salino de neutralização + CPP-ACP
Grupo BB <sub>2</sub>	solução ácida de colagénio + água bidestilada dH <sub>2</sub> O + tampão salino de neutralização + CPP-ACP
Grupo C	solução ácida de colagénio + CaCl <sub>2</sub> + tampão salino de neutralização + MTA
Grupo CC <sub>1</sub>	água bidestilada dH <sub>2</sub> O + CaCl <sub>2</sub> + tampão salino de neutralização + MTA
Grupo CC <sub>2</sub>	solução ácida de colagénio + água bidestilada dH <sub>2</sub> O + tampão salino de neutralização + MTA

A tabela 3 identifica as soluções preparadas e os reagentes específicos adquiridos e a figura 4 mostra o esquema dos passos experimentais realizados, com identificação dos grupos de trabalho.

Tabela 3- Soluções preparadas e reagentes específicos adquiridos para o passo da mineralização

Soluções preparadas
Solução de Ácido Clorídrico 10 mM (HCl)
Solução de Cloreto de Cálcio 0,1M (CaCl <sub>2</sub> )
Solução de Cloreto de Sódio 0,5 M (NaCl)
Solução Tampão de fosfatos de sódio 0,1 M, pH 7,4
Solução Tampão Tris (hidroximetil) aminometano 0,2 M, pH 7.4



Reagentes adquiridos	Fornecedor
Colagénio tipo I de cauda de rato	Sigma-Aldrich
Recaldent™ CCP-ACP	GC
ProRoot MTA™	Dentsply

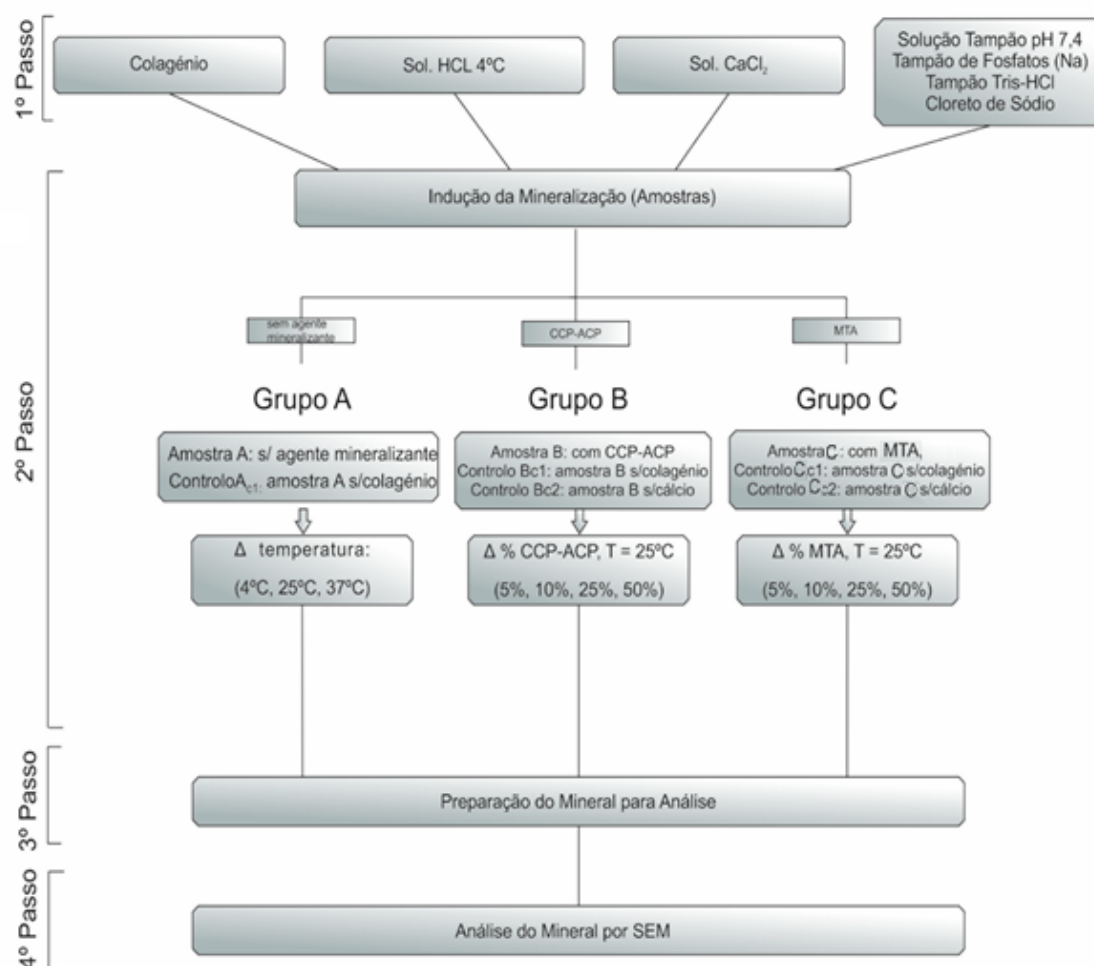


Figura 4 – Representação esquemática do procedimento experimental realizado. As letras A-C identificam as amostras do grupo a que pertencem; O índice “Ci” que sucede a letra do grupo identifica os controlos, sendo i o número do controlo (A<sub>C1</sub> corresponde ao único controlo do grupo A, B<sub>C1</sub>, B<sub>C2</sub> e C<sub>C1</sub>, C<sub>C2</sub> a cada um dos controlos dos grupos B e C).

## 1º PASSO: PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

As soluções identificadas na tabela 3 foram preparadas uma única vez, em quantidade suficiente para a totalidade dos ensaios requeridos e mantidas a 4°C até à sua utilização. À exceção da solução de ácido clorídrico 10 mM, que foi mantida sempre a 4°C, como recomendado no protocolo inicial (Cui et al., 2008), optou-se por permitir que as restantes soluções adquirissem uma temperatura próxima da ambiente antes do início do passo de mineralização (2º passo). Tal opção deveu-se a termos verificado, num estudo piloto, que a temperatura de incubação parecia afetar a velocidade de mineralização, assim como a proporção Ca/P dos cristais obtidos (resultados não apresentados).

A solução tampão de Tris-HCl, foi ajustada a pH 7,4 com ácido clorídrico, com recurso a um elétrico de pH calibrado na gama de pH 4,0-7,0 com soluções tampão padrão (figura 5).



Figura 5 - Medidor eletrónico de pH Crison GLP 22, Egas Moniz CRL. O elétrico foi calibrado com soluções tampão padrão pH 4 e pH 7

## 2º PASSO: INDUÇÃO DA MINERALIZAÇÃO

Cada amostra foi preparada por adição de HCl 10 mM, 4°C ao colagénio de modo a originar uma solução de colagénio 2 mg/ml. A 400 µl desta solução adicionou-se primeiro 150 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e posteriormente 800 µl de uma solução de neutralização previamente preparada por mistura 60:2:9 de tampão Tris-HCl 0,2 M,

cloreto de sódio 0,5 M e tampão fosfato de sódio 0,1 M. No caso dos grupos contendo agente mineralizante (grupos B e C), a percentagem pretendida de agente foi adicionada após pesagem precisa de cada agente, que foi inserido na solução juntamente ao  $\text{CaCl}_2$  0,1M com subtração do volume inserido da solução de NaCl presente na mistura tampão.

Cada controlo foi preparado substituindo o colagénio por igual volume de água bidestilada. Adicionalmente, no caso dos grupos B e C preparou-se ainda um segundo controlo, no qual se substituiu a solução de  $\text{CaCl}_2$  por água bidestilada e se manteve o colagénio, com o intuito de avaliar o potencial de formação de hidroxiapatite dos agentes mineralizantes na ausência de cálcio.

Após a adição da solução de neutralização, as amostras foram incubadas à temperatura de estudo: para os 4°C as amostras foram mantidas no frigorífico do laboratório; para a temperatura ambiente (~25°C) as amostras foram mantidas na bancada do laboratório; para os 37°C as amostras foram colocadas numa estufa de temperatura controlada. O passo de mineralização a diferentes temperaturas foi realizado apenas no grupo A, tendo este ensaio (ensaio piloto) permitido definir a temperatura ambiente (~25°C) como a temperatura de estudo no passo de mineralização do estudo propriamente dito (grupos A-C). O processo de mineralização evoluiu durante 72 horas.

Cada ensaio (incluindo não só as amostras mas também os controlos) foi realizado em triplicado.

### 3º PASSO: PREPARAÇÃO DO MINERAL PARA ANÁLISE

Imediatamente após o término do passo de indução da mineralização, as amostras foram centrifugadas numa microcentrífuga (figura 6), à velocidade máxima e durante 1 minuto, com o intuito de acelerar a separação completa das fases líquida e sólida. O mineral foi então recuperado por decantação, lavado com água bidestilada para reduzir a presença de sais solúveis como NaCl (observados em grande quantidade em amostras que não incluíram este passo) e seco ao ar em tubo invertido durante 48 horas. O sobrenadante, obtido por centrifugação, foi usado apenas para controlo do pH no final do passo de mineralização, tendo sido posteriormente descartado. Para a avaliação do pH do sobrenadante, não só pelo facto de se ter um volume insuficiente

deste para se poder recorrer a um elétrodo, mas também por apenas se pretender confirmar que se mantinha neutro, recorreu-se a tiras de papel indicador de pH.

Uma vez completamente seco, estimou-se a massa de mineral obtida em cada ensaio por pesagem em balança analítica. Uma vez que se fizeram triplicados, a massa estimada é um valor médio.



Figura 6- Centrífuga Eppendorf 5418, Egas Moniz CRL. Pot Máx: 16872.856 GForce

#### 4º PASSO: ANÁLISE DO MINERAL POR SEM

As análises por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia (Cmicros) da Egas Moniz, CRL, no equipamento JEOL LSM 5400 (figura 7). As amostras a serem analisadas foram primeiramente pulverizadas em almofariz de cerâmica e colocadas sobre fita adesiva de dupla face, num suporte próprio com capacidade para quatro amostras diferentes (figura 8). Um vez fixas no suporte, as amostras receberam um tratamento de paládio no evaporador a vácuo JEOL 400 (figura 9), por pulverização do metal em alto vácuo durante 15 minutos.



Figura 7- Microscópio eletrônico de varrimento JEOL JSM 5400, Cmicros Egas Moniz CRL



Figura 8- Amostras dispostas em uma fita de carbono, previamente à pulverização com paládio



Figura 9- Instrumento de evaporação a vácuo JEOL 400, Cmicros Egas Moniz CRL



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições experimentais propícias à obtenção de fibras de colagénio *in vitro* encontram-se já bastante bem estabelecidas, assim como foram já identificados diversos fatores que afetam a espontaneidade da associação ordenada das moléculas de colagénio, ou *self-assembly*, como comprovado por várias técnicas como variação da turbidez a 313 nm, por microscopia eletrónica de transmissão (TEM), microscopia de força atómica (AFM), microscopia confocal de refletância (CRM) e de fluorescência (CFM), dispersão dinâmica de luz (DLS), dicroísmo circular (CD), entre outras (Cui et al., 2008; Zhu et al., 2018). As moléculas de colagénio tipo I, organizadas em tripla hélice, tendem a associar-se e formar fibras *in vitro* quando colocadas em meios salinos e neutros. A acidificação prévia do colagénio protona os resíduos de aminoácido e destabilizará qualquer associação existente na proteína, provocando-lhe um desarranjo conformacional reversível ao qual o sistema responde procurando retomar a estabilidade, que está associada a uma diminuição da energia do sistema. Nesta fase de reorganização proteica, um meio salino e neutro favorece a reorganização das moléculas de colagénio em fibras, pelo que é fundamental que a solução tampão neutra contendo sais seja rapidamente adicionada à solução de colagénio acidificada pela adição de ácido clorídrico, quando se pretende induzir o *self-assembly* do colagénio *in vitro*.

No presente trabalho pretendia-se não só promover a formação de fibras de colagénio, mas concomitantemente iniciar o processo de mineralização. Assim, e seguindo alguns trabalhos prévios, adicionou-se uma solução de cloreto de cálcio (fonte de iões  $\text{Ca}^{2+}$ ) antes de adicionar o tampão salino de neutralização e este último continha tampão fosfato de sódio (fonte de  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Atendendo a que a proteína estava protonada quando se adicionou o cloreto de cálcio, é de esperar que os iões  $\text{Ca}^{2+}$  não tendam a interagir com as moléculas de colagénio senão quando o meio é neutralizado, por adição da solução salina tampão a pH 7,4, a qual favorece principalmente a desprotonação dos resíduos de aspartato e glutamato, que ficam negativos. Assim, com este procedimento experimental presume-se que ambas, formação de fibras de colagénio e formação do mineral, sejam iniciadas simultaneamente.

## GRUPO A

O grupo A corresponde à amostra preparada apenas com solução de colagénio em ácido, cloreto de cálcio e solução salina tampão contendo fosfato, não tendo sido adicionado qualquer agente mineralizante. O controlo deste grupo ( $A_c$ ) foi preparado da mesma forma que a amostra de estudo, mas substituindo o colagénio por igual volume de solução ácida (HCl 10 mM). Este estudo foi realizado a três temperaturas diferentes (4°, 25° e 37°C), de forma a poder decidir-se, por análise SEM e EDS, qual origina resultados mais promissores.

Ambos amostras e controlos foram colocados às temperaturas estipuladas em cada caso e foi-se acompanhado a evolução até às 72 horas de duração do ensaio. A figura 10 mostra o aspeto de um dos triplicados da amostra A aos tempos 0, 1, 24 e 72 horas de reação à temperatura ambiente, 25°C. Logo após a primeira hora de reação (Fig. 10,  $t_1$ ) foi possível observar o aumento da turbidez das soluções de amostra A, mais evidente nos ensaios a 25 e 37°C e muito menos notória nos ensaios a 4°C. O aumento da turbidez é uma característica bem documentada na literatura em ensaios de *self-assembly* de colagénio e é aceite pela comunidade científica como correspondendo à formação de fibrilhas de colagénio (Cui et al., 2008; Martínez-Ortiz et al., 2015; Zhu et al., 2018). Não é surpreendente que a 4°C as amostras A não se tenham apresentado tão turvas, uma vez que as temperaturas mais baixas tendem a reduzir as velocidades das reações, incluindo as de estabilização molecular.

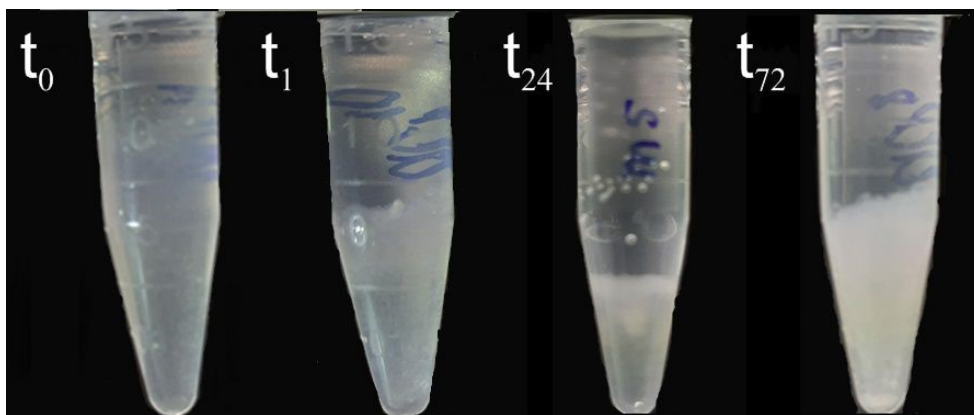


Figura 10 – Reação de mineralização *in vitro* da amostra A realizada a 25°C, no início do ensaio ( $t_0$ ), após 1 hora ( $t_1$ ), após 24 horas ( $t_{24}$ ) e no fim do ensaio ( $t_{72}$ ).



24 horas após o início da reação de mineralização, ambos os ensaios realizados com a amostra A a 25° (Fig. 10,  $t_{24}$ ) e 37°C mostraram a presença de uma fase sólida, aparentemente correspondente ao mineral em formação, apresentando esta uma área maior no caso da temperatura mais elevada. A amostra A a 4°C, ao tempo  $t=24$  horas, mostrou-se uniformemente turva, não tendo sido possível distinguir, em nenhum dos triplicados, a presença de mineral em formação. Tal, sugere uma formação de mineral dependente da temperatura, porém nada informa sobre o tipo de mineral em formação. Adicionalmente, a temperatura pode ter apenas um efeito na velocidade da reação e não no produto mineral que origina nem necessariamente na quantidade formada deste, uma vez que se trata de um sistema fechado.

A reação de mineralização terminou com a centrifugação das amostras e recuperação do mineral por remoção do sobrenadante. Embora as amostras se mostrassem todas uniformemente brancas no final da reação de mineralização (Fig. 10,  $t_{72}$ ), a centrifugação originou, em todos os casos, um sobrenadante esbranquiçado mas translúcido. O pH do sobrenadante foi controlado nesta fase (Fig. 11), revelando que a reação de mineralização se manteve sempre a um valor neutro ( $\text{pH} \approx 7$ ). Embora alguns autores defendam que a formação de hidroxiapatite concomitante com o *self-assembly* seja favorecida na gama pH 8-9 (Tomoaia & Pasca, 2015). Cui et al., 2008 obtiveram sucesso quando testaram a mineralização *in vitro* a pH 7,2, com alegada obtenção de hidroxiapatite, utilizando em condições semelhantes às aplicadas no presente trabalho. Não obstante os pH alcalinos favoreceram a formação da hidroxiapatite pela disponibilização de íons hidroxilo livres, valores de pH na gama neutra favorece uma formação mineral intra e interfibrilhar.

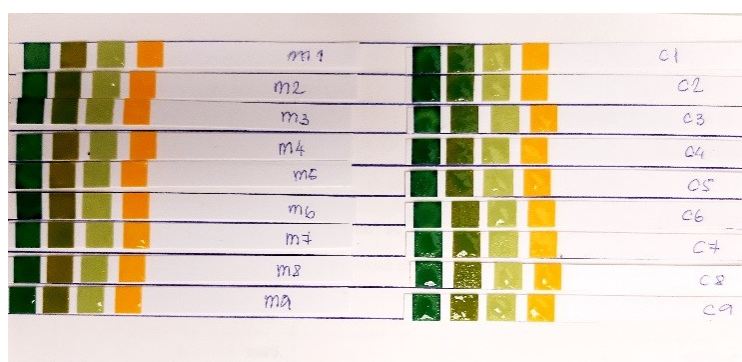


Figura 11- Valores de pH dos sobrenadantes obtidos após centrifugação das soluções de amostra A (à esquerda) e de controle Ac (à direita) às diferentes temperaturas de reação: 4°C (triplicados superiores), 25°C (triplicados intermédios), 37°C (triplicados inferiores)

O mineral (*pellet*) obtido por centrifugação em cada um dos ensaios, depois de lavado para remoção de eventuais sais solúveis co-precipitados à superfície do mineral, foi totalmente seco ao ar. Na tabela 4 encontram-se os valores médios das massas de mineral obtidas para cada temperatura. Ao contrário do esperado atendendo à velocidade de evolução da formação aparente de mineral (figura 10), a amostra a 37°C (A<sub>37</sub>) foi a que originou menor massa de mineral, ou porque se formou menos quantidade, ou porque o mineral formado é constituído por forma(s) de menor massa molar. Em quantidade efetiva, a amostra cuja reação evoluiu à temperatura ambiente foi a que produziu maior quantidade de mineral, tendo sido a única temperatura a originar uma quantidade de mineral na amostra francamente superior (massa amostra A – massa amostra A<sub>C</sub> = 17,4 mg) à do respetivo controlo (sem colagénio presente). Relativamente às outras duas temperaturas de reação, a 4°C obteve-se uma massa média de mineral superior no ensaio sem colagénio (controlo) e a 37°C, embora se tenha obtido uma massa superior na presença de colagénio (amostra), a diferença das massas médias é tão pequena (4,2 mg) que praticamente cai na margem de erro da balança. Estes resultados, apoiados pela análise SEM e EDS apresentadas mais à frente, definiram que os ensaios dos grupos B e C fossem realizados à temperatura ambiente.

Tabela 4- Massas médias de mineral seco obtidas após as reações de mineralização realizados às diferentes temperaturas. Médias de triplicados

	MASSA MÉDIA		
	4°C	25°C	37°C
<b>Amostra: A</b>	0,0342 g	0,0548 g	0,0331 g
<b>Controlo: A<sub>C</sub></b>	0,0365 g	0,0374 g	0,0289 g

Embora a simples análise das massas obtidas não nos permita tirar conclusões, não deixa de ser curioso constatar que diversos artigos na literatura sugerem a temperatura ambiente como a mais indicada para estudos *in vitro* de *self-assembly* do colagénio com a mineralização. A formação da hidroxiapatite é precedida por uma forma amorfa, transiente, que quando estabilizada não evolui para hidroxiapatite. De facto, alguns estudos sugerem que fatores como as baixas temperaturas (incluindo 4°C) estabilizem a forma amorfa, prevenindo a sua evolução para hidroxiapatite. O aumento

da temperatura para valores na gama 20-25°C (temperatura ambiente), de acordo com os mesmos estudos parecem destabilizar a forma amorfa e favorecem a formação de mineral (Toroian et al., 2007; Nudelman et al., 2011; Lausch et al., 2013). Por outro lado, o aumento da temperatura acima da ambiente e em condições *in vitro*, afeta necessariamente a organização tridimensional do colagénio, desfavorecendo algumas interações, o que por sua vez terá implicações a nível da mineralização.

#### ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO (SEM) E ANÁLISE ELEMENTAR (EDS)

As amostras A<sub>4</sub>, A<sub>25</sub> e A<sub>37</sub> e os respetivos controlos, A<sub>C4</sub>, A<sub>C25</sub> e A<sub>C37</sub> foram analisados por SEM às ampliações 500x, 1000x, 1500x, 2000x.

Ilustrando e descrevendo, a imagem presente na figura 12 apresenta-se com carácter uniforme e sugere uma homogeneidade do mineral analisado e depositado sobre uma matriz. A organização estrutural presente na imagem foi atribuída à influência exercida pela *self-assembly* do colagénio, enquanto que noutra figura, como exemplo a figura 13 do Grupo Ac – controlo, a mineralização careceu de uma organização em camadas na sua estrutura matricial. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de (Sommerdijk et al., 2010; Sone et al., 2013), que afirmaram ser a estrutura do colagénio necessária para a estruturação e o crescimento cristalino. Posteriormente, foi demonstrado por (Sommerdijk et al., 2005, 2011), que o colagénio controla dois importantes passos na mineralização – a infiltração da fase mineral na forma de um precursor amorfo na fibra e sua subsequente transformação em cristais de apatite orientados.

As imagens, índices de massa e proporções Ca/P (1,72, próxima à estequiométrica de 1,67 para HAP como observado na Tabela 5) obtidas à temperatura de 25°C estão de acordo com os trabalhos de (Sone et al., 2013), que afirmam que às temperaturas ideais uma taxa de deposição mineral aumentada pode ser encontrada, favorecendo a formação de cristais de apatite. Foi sugerido ainda por estes autores que uma fase amorfa formada a velocidades maiores é menos estável e portanto cristaliza-se mais rapidamente.

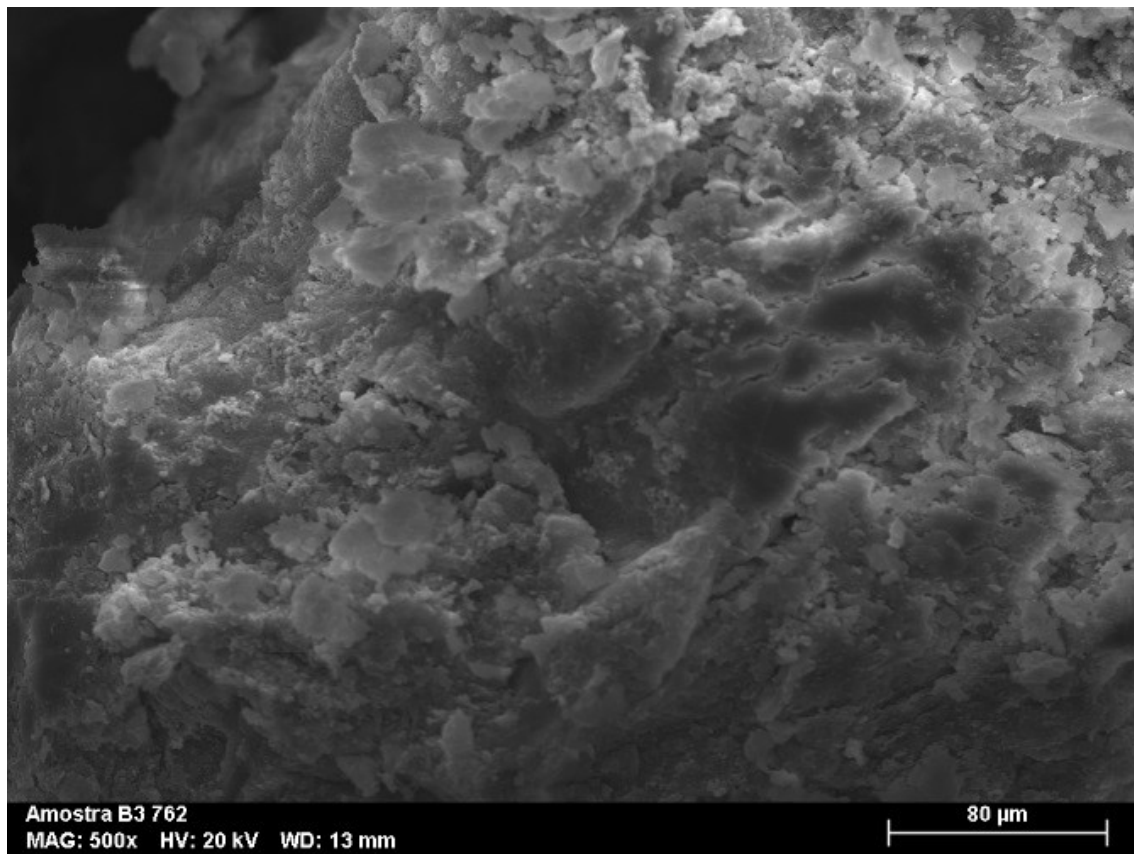


Figura 12 - Grupo A - Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água a 25°C – padrão representativo de homogeneidade na amostra com orientação guiada com buracos de colagénio eventualmente críticos, em camada subjacente, amostra compatível com fosfato de cálcio amorfo

Tabela 5 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo A a 25°C

	EDS	Proporção Ca/P
Grupo A Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água	1	1,61
	2	1,76
	3	1,74
	4	1,79
	5	1,62
	6	1,78
	Média Total	1,72

Esta hipótese é também corroborada por (Sommerdijk et al., 2011), que estudaram a mineralização na presença de íons de cobre - conhecidos por estabilizar o fosfato de cálcio amorfo, assim como por inibir a sua transformação em apatite. Estes autores sugerem que as partículas de ACP devem permanecer suficientemente estáveis para que sua difusão pelo colagénio aconteça, mas não estáveis o bastante para que sua cristalização em apatite (no interior das fibras de colagénio) seja inibida.

Por outro lado, a temperaturas mais elevadas, com uma formação mineral acelerada, uma estabilização do ACP também poderia acontecer, por apresentar-se como uma fase cineticamente mais disponível, todavia sem a conformação estrutural necessária para penetrar nas fibras de colagénio, tornando pouco provável a cristalização do mineral obtido.

Vale ressaltar novamente que, das proporções Ca/P apresentadas acima, os valores que mais se assemelham aos apresentados por (Yang, et al., 2012) para a hidroxiapatite estequiométrica foram os conseguidos à 25°C, com 1,72. Todas as demais amostras, incluindo os grupos controlo, apresentaram médias similares às apresentadas para o fosfato de cálcio amorfo (Tabela 6). Entretanto, apesar de apresentar um valor similar, não se pode concluir com as análises realizadas o material presente na amostra.

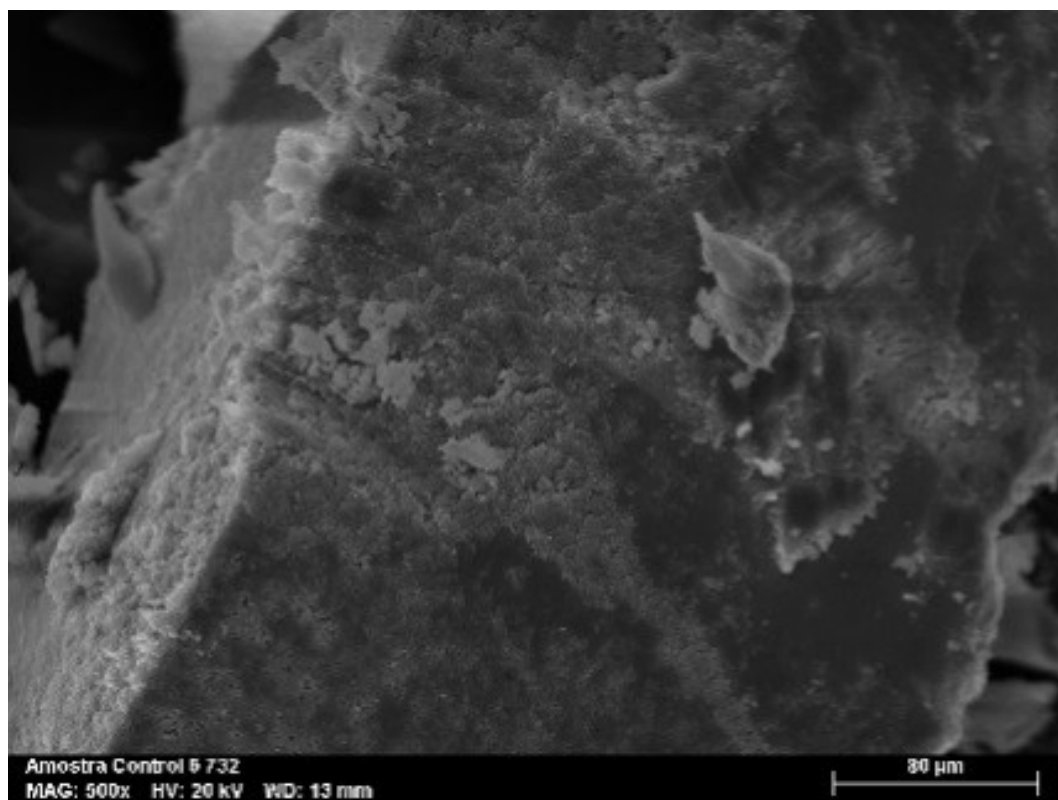


Figura 13 - Grupo Ac (controle) - Mineralização na ausência de colagénio e na presença de cloreto de cálcio + água a 25°C – padrão representativo de depósito mineral de cálcio sobreposto de forma isolada, na estrutura, com aglomerados visíveis isolados, compatíveis com fosfato de cálcio

Tabela 6 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Ac a 25°C

	EDS	Proporção Ca/P
Grupo Ac Mineralização na ausência de colagénio e presença de cloreto de cálcio + água a 25°C	1	2,28
	2	2,11
	3	2,13
	4	1,98
	5	2,25
	6	2,19
	Média Total	2,15

Freeman et al., (2006); Landis & Jacquet, (2013), em seus respectivos trabalhos, afirmam que a nucleação da apatite é induzida por sítios específicos formados por

*clusters* de aminoácidos carregados que estão presentes pela estrutura de 67 nm encontrada no colagénio. Na ausência de NPCs, como no presente estudo, estes resultados evidenciam experimentalmente o papel ativo do colagénio ao controlar a mineralização, fundamentando a noção de que grupos carregados no colagénio fornecem sítios de nucleação para induzir a formação de apatite.

Embora o colagénio tenha sido considerado durante muito tempo como uma matriz inerte sobre a qual a mineralização acontece, esta proteína, com suas particularidades, demonstra possuir um papel mais ativo na mineralização orientada *in vitro*, ao contrário do que foi afirmado nos trabalhos de (Bradtet al., 1999). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os trabalhos de (Wang et al., 2012; Landis & Jacquet, 2013), que obtiveram uma mineralização *in vitro* do colagénio sem a utilização dos demais agentes mineralizadores e de análogos de NPCs, demonstrando ser possível uma mineralização intrafibrilar em matrizes de alta densidade, em soluções supersaturadas de cálcio e fosfato. Além disso, estes autores concluíram que o colagénio possui um papel ativo na biomineralização, assim como serve de matriz para a formação de hidroxiapatite.

Ainda, de acordo com os trabalhos de (Landis & Jacquet, 2013), a mineralização, crescimento e desenvolvimento subsequente associados com as regiões intrafibrilares podem ser considerados pela perspectiva de uma cristalização clássica, na qual a formação de apatite pode ser definida como uma nucleação heterogênea dentro de uma solução supersaturada de iões cálcio e fosfato. Em tais soluções, a presença de outras moléculas além da apatite resulta na queda da barreira energética de energia livre de Gibbs com a formação de núcleos mais estáveis. Uma vez formados, estes núcleos crescem espontaneamente por acumulação de iões adicionais quando há uma queda da energia livre relativa ao crescimento individual destes mesmos núcleos.

## GRUPO B

O grupo B corresponde à amostra preparada com solução de colagénio em ácido, cloreto de cálcio, solução salina tampão contendo fosfato e agente mineralizante Recalldent™ CCP-ACP. Realizaram-se quatro ensaios, cada um contendo uma massa diferente de agente mineralizante (5%, 10%, 25% e 50%), as quais passaram a ser

referidas por B<sub>25-5</sub>, B<sub>25-10</sub>, B<sub>25-25</sub> e B<sub>25-50</sub>, respetivamente. Cada ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente.

Para este grupo realizaram-se dois tipos de controlo: (B<sub>C1</sub>) preparado da mesma forma que as amostras B, para cada uma das percentagens de CPP-ACP, mas substituindo o colagénio por igual volume de dH<sub>2</sub>O; (B<sub>C2</sub>) preparado da mesma forma que as amostras B, para cada uma das percentagens de CPP-ACP, mas substituindo cloreto de cálcio por igual volume de dH<sub>2</sub>O. Cada ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente.

Comparativamente, os aspetos macroscópicos destas amostras apresentaram as menores velocidades de reação. Alterações visuais só foram passíveis de serem determinadas ao fim das três primeiras horas de reação. As amostras B<sub>25-50</sub> mostraram altos índices de turbidez da solução, dificultando os registos da formação mineral. Todavia, foi possível acompanhar os resultados da reação para as restantes percentagens de agente, podendo destacar-se as soluções a B<sub>25-5</sub> que, ao contrário dos restantes grupos avaliados no presente trabalho, apresentou formação mineral constante até às 72 horas.

No que se diz respeito aos valores de pH dos sobrenadantes obtidos após centrifugação, em todos os casos obteve-se um valor próximo de 7, sugerindo que as reações de mineralização evoluíram sempre a um pH neutro, independentemente da percentagem de CCP-ACP adicionada (figura 14).



Figura 14- Valores de pH dos sobrenadantes obtidos após centrifugação das soluções de amostra B. Da esquerda para a direita, em grupos de 3 correspondendo aos triplicados: 5%, 10%, 25% e 50% de CCP-ACP



## ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO (SEM) E ANÁLISE ELEMENTAR (EDS)

Assim como realizado para o grupo A, as amostras foram analisadas a diferentes ampliações, todavia optou-se pela ampliação a 500x, para uma melhor comparação dos padrões obtidos para as diferentes quantidades de CCP-ACP, que podem ser visualizados na figura 15.

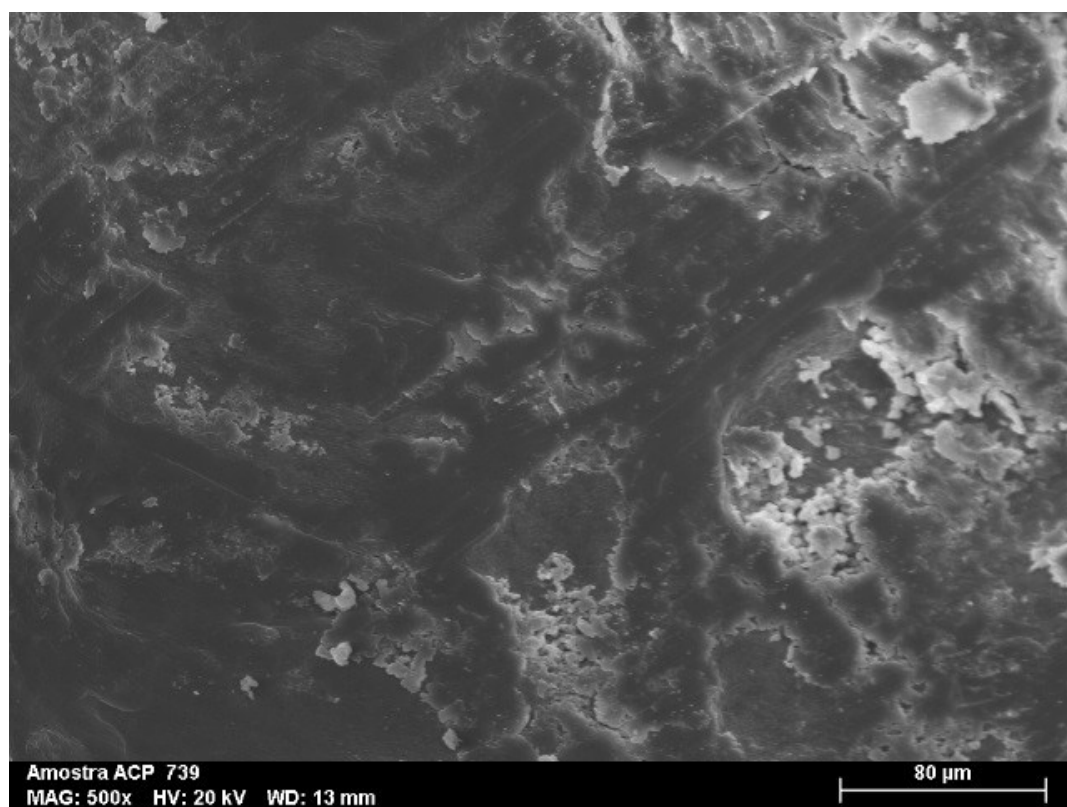


Figura 15- Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP, sem visualização de buracos de colagénio críticos, com zonas de padrão homogêneo e com zonas de infiltração mineral homogêneas, integradas na estrutura e camadas de sobreposição, com material preenchimento lacunar, compatível com uma apatite supersaturada em fosfato de cálcio

Tabela 7 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo B com adição de 5% de CCP-ACP

	EDS	Proporção Ca/P
<b>Grupo B</b> <b>Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP</b>	<b>1</b>	2,54
	<b>2</b>	1,98
	<b>3</b>	1,96
	<b>4</b>	2,23
	<b>5</b>	1,9
	<b>6</b>	2,17
	Média Total	2,14

Ao verificar-se a imagem obtida para o padrão de mineralização do CCP-ACP na presença de colagénio e de cálcio, um padrão diferente do obtido no Grupo A pode ser observado, embora a superfície do mineral à ampliação escolhida manteve-se uniforme. Isso sugere que o mineral obtido é homogêneo e possivelmente constitui-se em camada de uma apatite supersaturada em fosfato de cálcio. Estes resultados estão de acordo com Lin et al., 2017, e como pode ser visto na tabela 6, o valor médio da proporção de Ca/P obtida por EDS foi de 2,14.

Todavia, de forma alternativa, o padrão de mineralização para os grupos controlo na ausência de colagénio (B<sub>C1</sub>) (Figura 16) e de cálcio (B<sub>C2</sub>) (Figura 17) carece do padrão aqui apresentado para o grupo experimental, com distintos traços de fratura, e descritivamente compatível com fosfato de cálcio amorfo. Entretanto, e de acordo com os trabalhos de Landis & Jacquet, 2013; Zhu et al., 2018, na amostra B<sub>C2</sub>, na presença de colagénio, pode-se notar alguns aglomerados visíveis, com uma tendência maior de organização quando comparado com o padrão apresentado pelo grupo B<sub>C1</sub>, sugerindo um papel ativo do colagénio na mineralização *in vitro* do agente, como poderá ser notado na figura 17.

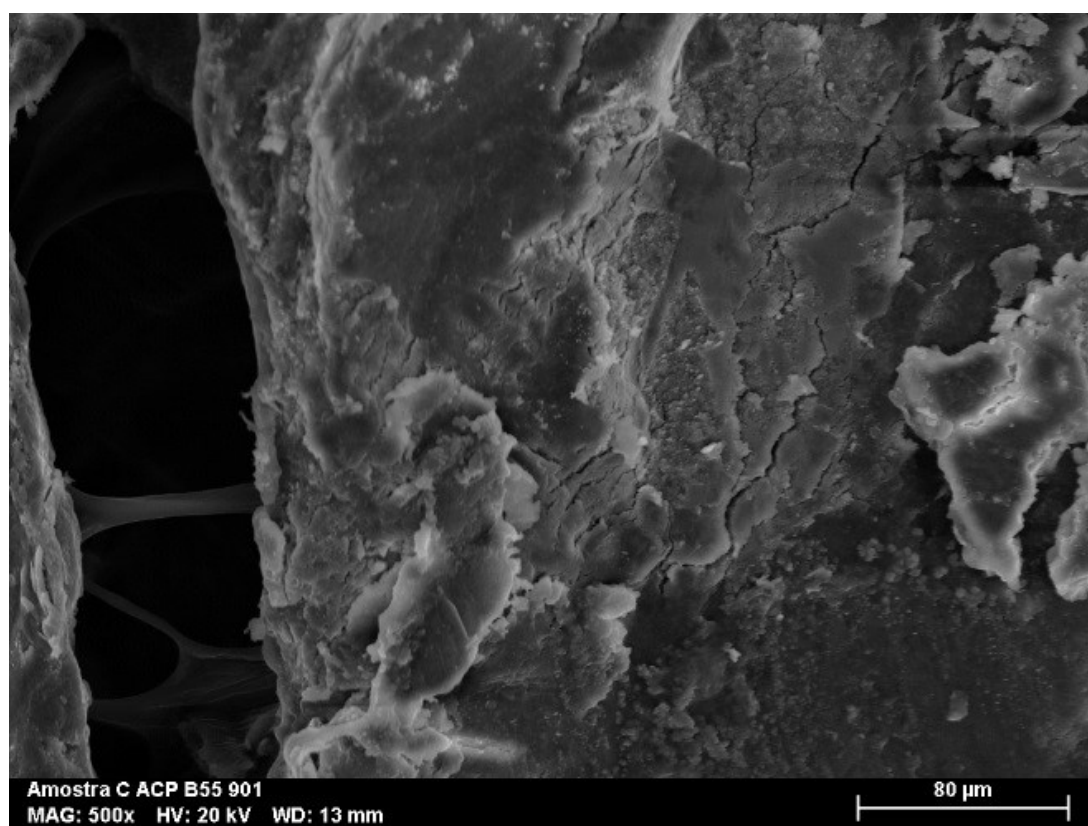


Figura 16- Mineralização do controle na ausência de colagénio e presença de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP, com aglomerados minerais, visíveis e isolados, com ausência tendencial de padrão e lacunas visíveis, distintos traços de fratura, e imagem descritivamente compatível com fosfato de cálcio amorfo

Tabela 8 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Bc<sub>1</sub> com adição de 5% de CCP-ACP

Grupo Bc <sub>1</sub> Mineralização do controle na ausência de colagénio e presença de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP	EDS	Proporção Ca/P
	1	2,45
	2	2,57
	3	1,88
	4	2,67
	5	2,41
	6	2,12
	Média Total	2,35

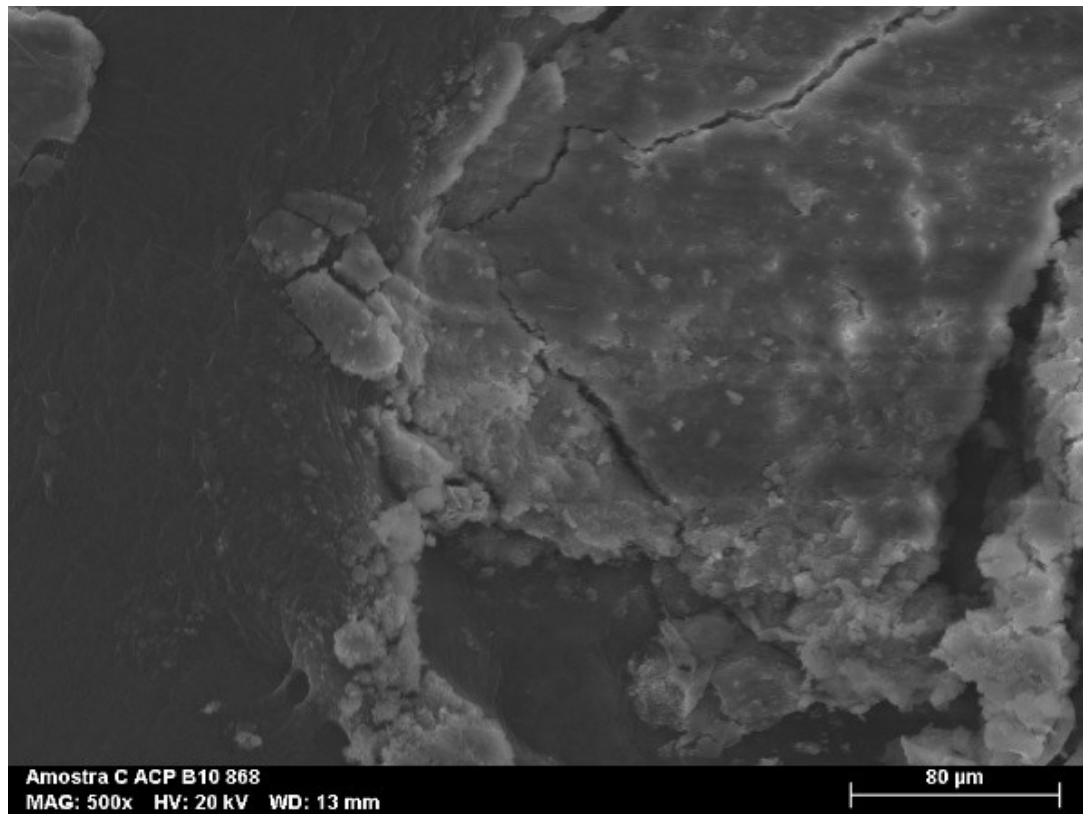


Figura 17- Mineralização do controle na presença de colagénio e ausência de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP, com aglomerados minerais, visíveis e agregados, com tendência organização de padrão, traços de fratura e imagem descritivamente compatível com fosfato de cálcio amorfo

Tabela 9 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Bc<sub>2</sub> com adição de 5% de CCP-ACP

Grupo Bc <sub>2</sub> Mineralização do controle na presença de colagénio e ausência de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de CCP-ACP	EDS	Proporção Ca/P
	1	2,71
	2	3,12
	3	2,38
	4	2,41
	5	2,38
	6	2,24
	Média Total	2,54

As tabelas 8 e 9 exibem as médias das análises elementares realizadas por EDS, com valores discretamente maiores dos apresentados por Zhao et al., 2012. Poggio et al., (2013), afirmaram que o CCP possui a capacidade de estabilizar o ACP. Esta estabilização do componente amorfo, pode favorecer a formação de aglomerados com diâmetros maiores do que os 6kDa, o que de acordo com Landis & Jacquet (2013) inviabilizaria a penetração do ACP nos buracos de colagénio, inviabilizando desta maneira, num ambiente carente de NPCs a mineralização intrafibrilhar do colagénio. Entretanto, num modelo de nucleação *in vitro* como o proposto pelo presente trabalho, simultaneamente ao *self-assembly* do colagénio, o componente amorfo poderia favorecer a formação de apatite por fornecer a fase transiente durante a reorganização das fibras de colagénio, daí as imagens de microscopia afirmarem que descritivamente poderemos estar a visualizar com fosfato de cálcio amorfo, corroborado pelas evidentes proporções Ca/P.

Zhao et al., (2012) afirmam ser possível que o ACP atue como uma matriz para o crescimento de fases cristalinas como OCP e HAP. Esta formação, entretanto, aparenta originar-se no consumo de iões amplamente fornecidos pelo meio e não da hidrólise direta do próprio material amorfo. Isso explicaria o motivo pelo qual o CCP-ACP apresenta um padrão de mineralização distinto pelo método *in vitro* empregado: ao ser estabilizado pelo CCP, a fase amorfa funcionaria como um *template* para a formação mineral, independente da matriz fornecida pelas fibras de colagénio, todavia com potencial para a formação de apatite.

De acordo com George & Veis (2011), a natureza excludente do colagénio a moléculas com tamanhos maiores que 6kDa impediria a atuação do ACP na mineralização intrafibrilhar, o que não o limitaria de participar do crescimento dos cristais pós-nucleação. Pelo padrão demonstrado, o presente estudo contraria o autor e sugere que o CCP-ACP, no sistema proposto por este trabalho, atingiria a sua estabilidade estrutural dependente da estrutura formada pelo colagénio, além de recrutar iões da solução.

## GRUPO C

O grupo C corresponde à amostra preparada com solução de colagénio em ácido, cloreto de cálcio, solução salina tampão contendo fosfato e agente mineralizante

ProRoot® MTA. Realizaram-se quatro ensaios, cada um contendo uma massa diferente de agente mineralizante (5%, 10%, 25% e 50%), as quais passaram a ser referidas por C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>25</sub> e C<sub>50</sub>, respetivamente. Cada ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente.

Para este grupo realizaram-se dois tipos de controlo: (C<sub>C1</sub>) preparado da mesma forma que as amostras C, para cada uma das percentagens de MTA, mas substituindo o colagénio por igual volume de solução dH<sub>2</sub>O; (C<sub>C1</sub>) preparado da mesma forma que as amostras B, para cada uma das percentagens de MTA, mas substituindo cloreto de cálcio por igual volume de dH<sub>2</sub>O. Cada ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente.

Considerando a formação mineral, todas as amostras apresentaram algum nível de mineralização antes dos primeiros 20 minutos. Entretanto, durante as 72 horas seguintes não foi possível diferenciar macroscopicamente as quantidades de mineral formado entre as amostras, embora as amostras C<sub>25</sub> e C<sub>50</sub> apresentassem uma coloração levemente amarelada como pode ser visto na figura 18. Tal pode ser atribuído ao grande conteúdo de sílica presente no material.

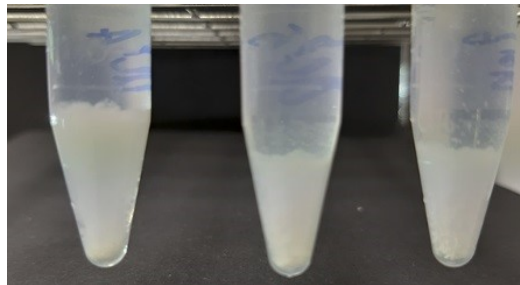


Figura 18- Aspeto macroscópico das amostras C<sub>25-25</sub>

Ao contrário do verifica nos grupos A e B, os valores de pH do sobrenadante obtido por centrifugação do produto da reação de mineralização para extração do mineral revelou uma basificação do meio (figura 19). Registou-se pH 11 para C<sub>50</sub>, pH 9 para C<sub>25</sub> e C<sub>10</sub> e pH 8 para C<sub>5</sub>, tendo-se verificado a mesma variação em ambos os grupos controlo, em relação às respetivas percentagens de agente mineralizante. Data a aparente proporcionalidade direta da basificação com o aumento da percentagem de MTA no meio, tal sugere que este agente se comporte como uma base forte.



Figura 19- pHs medidos resultantes das soluções experimentais contendo MTA

A alcalinização do meio encontra-se de acordo com os trabalhos de Sarkar et al., (2005), que afirmaram que o ProRoot® MTA induz a formação de um pH alcalino *in vitro*, em soluções aquosas. Os mesmos autores relacionam este fenómeno com a formação de hidróxido de cálcio (*portlandite*), produzida pelos silicatos de cálcio durante o tempo de presa do cimento. Tal propriedade torna a utilização do MTA desejável e explicam o sucesso do mesmo em condições clínicas que submetem o substrato dentário e tecidos circundantes a um meio ácido, tal como em cáries profundas, hiperemias pulpares e até mesmo na resolução de inflamações crônicas como no caso de retro-obturações pós-apicetomia. Além de basificar o meio, os silicatos de cálcio constituem-se como uma fonte de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para a formação mineral.

#### ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE VARRIMENTO (SEM) E ANÁLISE ELEMENTAR (EDS)

Assim como realizado para o Grupo A e B, as amostras foram analisadas a diferentes ampliações, variando de 500-2000x, todavia, para uma melhor comparação dos padrões obtidos para as diferentes quantidades de MTA utilizado, optou-se pela ampliação a 500x.

Como pode ser verificado na figura 20, o padrão estrutural apresentado, com camadas sobrepostas distintas de deposição são compatíveis com uma apatite de silicato de cálcio. Em concordância com os trabalhos de Niu et al., (2017) que dissertam sobre a capacidade formadora de apatite do MTA, principalmente relacionada com a sua capacidade de liberação de iões de cálcio, assim como no seu papel de matriz mineralizadora, com a atração de iões pelos grupos de sílica na sua constituição.

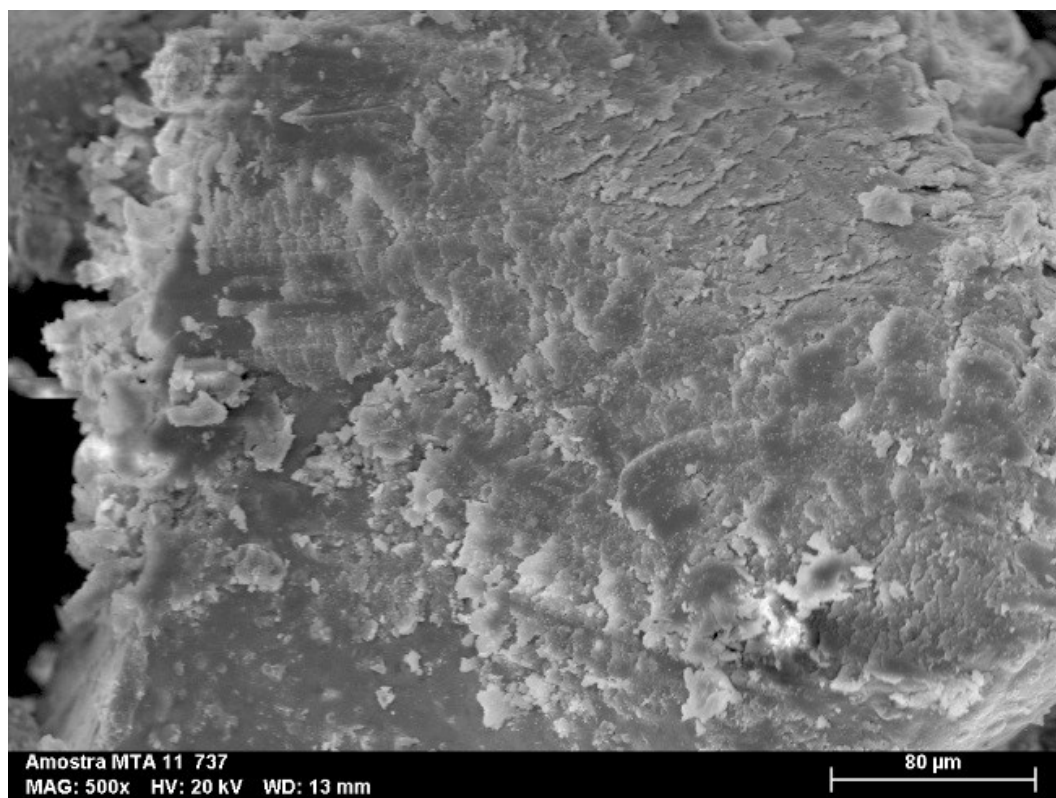


Figura 20 - Mineralização na presença de colagénio e cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA, com distintas zonas/camadas de sobreposição mineral, com padrão estrutural, compatível com apatite de um silicato de cálcio supersaturada

Tabela 10 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo C com adição de 5% de MTA

	EDS	Proporção Ca/P
<b>Grupo C</b> <b>Mineralização na presença</b> <b>de colagénio e cloreto de</b> <b>cálcio + água com adição</b> <b>de 5% de MTA</b>	1	3,45
	2	2,53
	3	2,51
	4	3,19
	5	3,64
	6	2,48
	Média Total	2,96

Por outro lado, os padrões de mineralização apresentados pelos grupos controlo são muito diferentes entre si. Relativamente ao grupo na ausência de colagénio (C<sub>C1</sub>), há



uma ausência de homogeneidade no mineral obtido, (Figura 21) com uma estrutura pouco desenvolvida e sem padrão definido. Como pode ser visto nas médias das análises elementares das tabelas 10 e 11, apresenta um alto valor para a proporção Ca/P. Ao comparar-se com o grupo controle na presença de colagénio (Cc<sub>2</sub>) (Figura 22), novamente a superfície estruturada sugere um papel ativo da proteína no processo de mineralização.

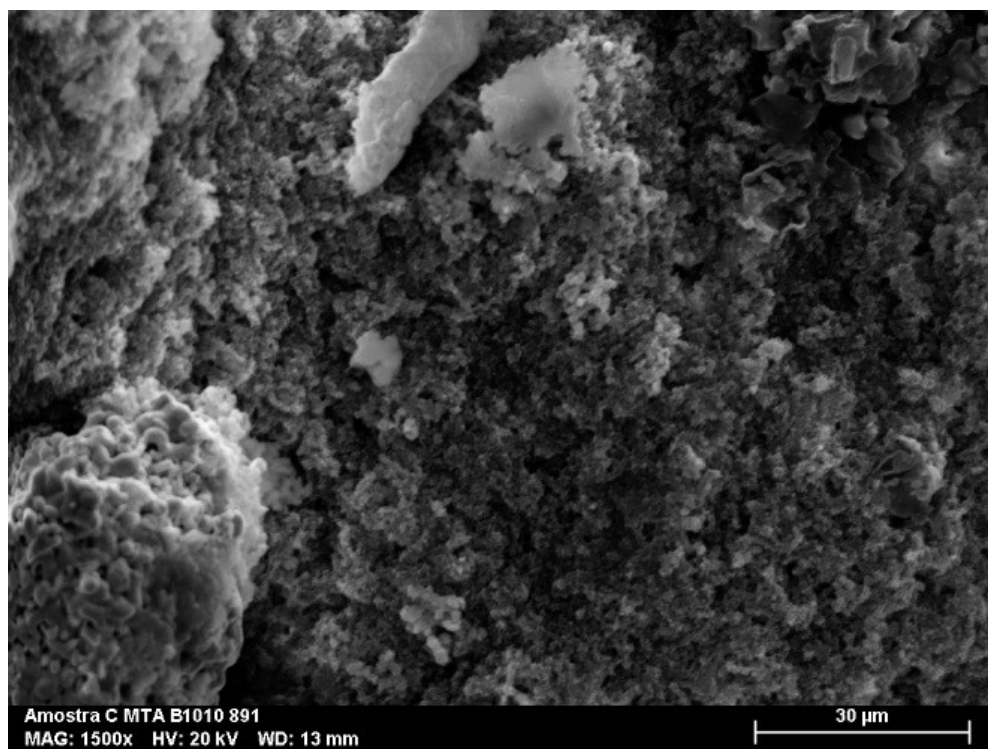


Figura 21- - Mineralização do controle na ausência de colagénio e presença de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA, com aglomerados minerais densos, visíveis e forma pouco integrada na estrutura, agregação isolada, com ausência tendencial de padrão e inúmeras lacunas visíveis

Tabela 11 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Cc<sub>1</sub> com adição de 5% de MTA

	EDS	Proporção Ca/P
<b>Grupo Cc<sub>1</sub></b> <b>Mineralização do controle</b> <b>na ausência de colagénio</b> <b>e presença de cloreto de</b> <b>cálcio + água com adição</b> <b>de 5% de MTA</b>	1	2,64
	2	3,24
	3	3,67
	4	5,53
	5	3,02
	6	3,78
	Média Total	3,64

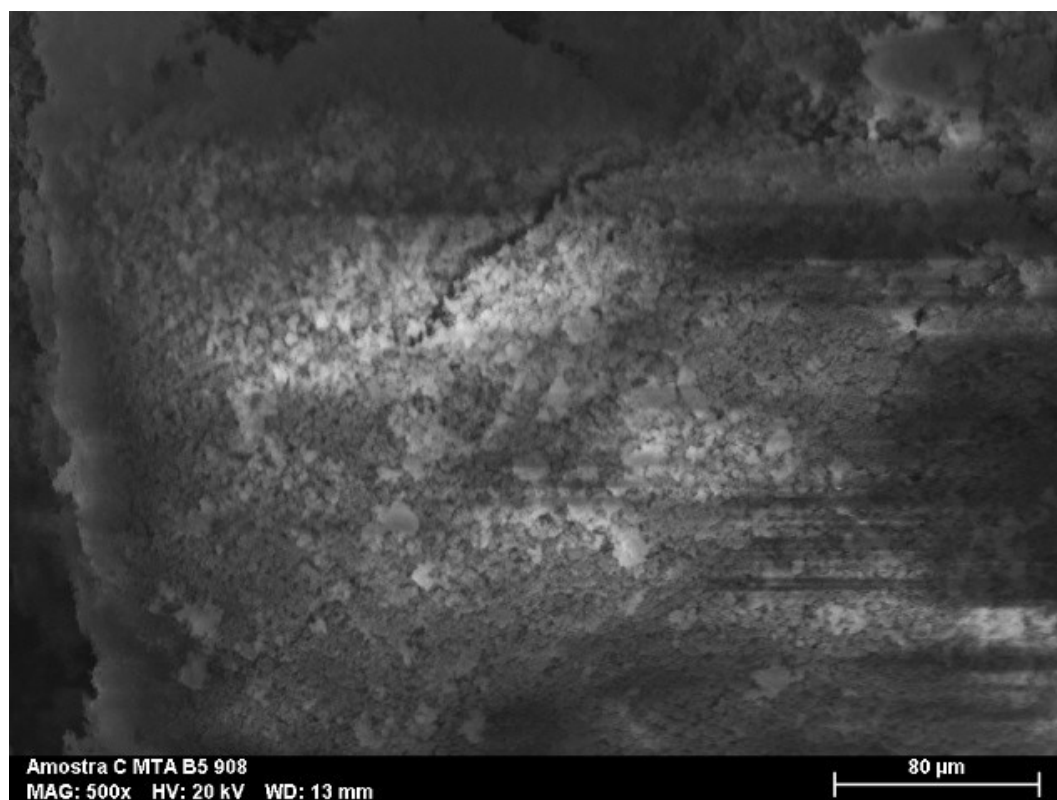


Figura 22 - Mineralização do controle na presença de colagénio e ausência de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA, com aglomerados minerais, visíveis e agregados, com tendência organização de padrão, embora se notem linhas de fratura e espaços lacunares com superfície mais irregular, podendo a mesma ser propícia à expansão de particulado de apatite

Tabela 12 - Valores de EDS e cálculo da média para o Grupo Cc<sub>2</sub> com adição de 5% de MTA

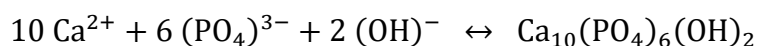
Grupo Cc <sub>2</sub> Mineralização do controle na presença de colagénio e ausência de cloreto de cálcio + água com adição de 5% de MTA	EDS	Proporção Ca/P
	1	2,53
	2	1,92
	3	3,7
	4	2,43
	5	2,01
	6	2,26
	Média Total	2,47

Conhecido pelo seu papel como reservatório de iões e matriz de mineralização, ao ser inserido num ambiente carente de cálcio, mas na presença de colagénio, com uma

proporção média menor de Ca/P que a apresentada pelo primeiro grupo controle, sugere-se que o padrão de mineralização obtido se tenha originado na formação de cálcio livre pela dissolução do MTA *in vitro*, originando um padrão mais organizado do mineral. Este papel do MTA como um reservatório de íons de cálcio e está de acordo com os trabalhos de Duarte et al., (2018), e sugere que parte do material adicionado sofreu dissolução para o meio, pois apesar de constituído por cálcio, estes íons, a fim de mineralizarem e formarem apatite, devem estar na sua forma ionizada livre. Do contrário, o material possuiria uma menor biocompatibilidade. As médias das proporções de Ca/P obtidas por EDS podem ser visualizadas na tabela 12.

Ainda, a capacidade dos cimentos de silicato de cálcio de induzir a formação de depósitos de apatite e de possuir capacidades bioativas quando imersos em soluções fosfatadas é conhecida. No presente estudo, os grupos experimentais contendo ProRoot® MTA apresentaram padrões de mineralização sugestivos de formação de apatite, demonstrando serem influenciados de certa forma pela presença da proteína. Ainda, de acordo com a tabela 10, o grupo C apresentou altos valores para as proporções de Ca/P, o que está de acordo com os trabalhos de Di Foggia et al., (2019); Sarkar et al., (2005). Todavia, as proporções de Ca/P encontradas não são condizentes com HAP estequiométrica.

Os resultados apresentados pelo vigente trabalho estão de acordo com as análises de espectroscopia realizada por Di Foggia et al., (2019), os quais sugeriram que o ProRoot® MTA passa por dissolução em soluções, libertando assim parte dos seus componentes catiónicos, sendo o  $\text{Ca}^{2+}$  o componente mais expressivo. Todavia, ao limitar-se o processo de mineralização a 72 horas (o MTA possui o potencial de liberar íons por semanas) e adicionar o material numa solução supersaturada de cálcio, restringiu-se o potencial de liberação de íons do material. Entretanto, ainda de acordo com os autores mencionados, por ser parcamente solúvel em fluidos biológicos, a presença de MTA desencadearia a precipitação de HA. A reação especificamente responsável por esta precipitação é a seguinte:



A reação acima é conhecida nos processos de calcificação biológica e é favorecida a pH 7. Segundo Fernandes et al., (2018), esta reação ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro* com muitos materiais contendo cálcio em sua composição, em contato

com fluidos biológicos. Devido à natureza porosa deste material, é concebível que esta precipitação continue internamente e leve a uma mudança na sua composição geral, como quando em contato com a dentina *in vivo*. Vale salientar que todo material coberto por uma camada de apatite, em proximidade com tecidos calcificados forma com estes uma interação química.

Estudos recentes de (Tay et al., 2007; Giovanna et al., 2010), demonstraram a habilidade dos cimentos de silicato de cálcio utilizados para selar raízes em associação com a gutta-percha. A formação de apatite pode melhorar a habilidade de vedação e contribuir para preencher as porosidades marginais ao redor de restaurações. Ainda segundo (Gandolfi et al., 2008), a formação de apatite na superfície externa pode contribuir para a expansão do cimento. Finalmente, esta apatite pode contribuir para a biomineralização da dentina ao redor de restaurações, um biomecanismo recentemente proposto por (Tay et al., 2007).

Estudos recentes conduzidos por (Giovanna et al., 2010; Di Foggia et al., 2019) levantaram algumas hipóteses quanto ao mecanismo de ação do MTA e de sua bioatividade:

- (i) Uma interface sólido-líquido forma-se nas partículas minerais e a dissolução iônica ocorre quase que imediatamente. Os íons de cálcio rapidamente migram para a solução e formas de hidróxido de cálcio são originadas;
- (ii) Os grupos silicato são atacados por íons hidroxilo (hidrólise dos grupos silicatos em ambiente alcalino) e fases de CSH (silicato de cálcio hidratado) são formadas nas partículas minerais. O CSH é uma camada porosa, fina e altamente desorganizada de um gel de silicato hidratado contendo grupos Si-OH silanol e superfícies carregadas negativamente que podem atuar como sítios de nucleação para a formação de apatite;
- (iii) O CSH contém um excesso de hidróxido de cálcio (formado por íons OH<sup>-</sup> das moléculas de água dissociadas com íons de Ca<sup>2+</sup> das partículas de cimento), como revelado pela presença de portlandite no interior da fase de CSH na superfície do cimento após armazenamento de 5 horas em DPBS. Um fluxo contínuo do excesso de portlandite formado na estrutura de CHS ocorre; o portlandite difunde-se para o exterior e passa à solução, e um grande aumento no pH ocorre. Os íons de cálcio em excesso difundem-se pela camada inicial de CHS, causando uma supersaturação relativa ao hidróxido de cálcio. Cristais de portlandite sofrem nucleação pela pasta e podem ser detetados na superfície. A liberação de portlandite continua pelo

período de armazenamento, como foi revelado pelo pH da solução, que permanece constante.

- (iv) Quando exposto a uma solução contendo fosfato como DPBS, uma série de reações tomam lugar na superfície do ProRoot® MTA entre o cálcio do cimento e o fosfato da solução, nomeadamente a absorção de íons de Ca e P da superfície rica em sílica do CSH (como resultado de uma supersaturação local) e a precipitação de uma apatite contendo  $\text{HPO}_4^{2-}$ , que amadurece em uma fase de HCA tipo-B em tempos maiores de armazenamento de solução. A camada de apatite preenche as porosidades superficiais e pode expandir a massa do cimento.

Todavia, contrariamente aos trabalhos mencionados acima, e apesar do padrão de mineralização resultante, como pode ser visto nas tabelas 10 e 11 relativas à proporção Ca/P, obtidas por EDS, não foram encontradas proporções para o ProRoot® MTA similares às propostas para a hidroxiapatite estequiométrica de 1,67. Como o presente estudo possui tempo de incubação das amostras relativamente pequeno, e sabendo-se da propriedade do MTA de atuar como reservatório de íons de cálcio, acredita-se que, com tempos maiores de incubação, melhores proporções de Ca/P seriam obtidas, com valores mais próximos dos esperados para a hidroxiapatite, especialmente nas amostras C<sub>25-25</sub> e C<sub>25-10</sub>.

De uma visão clínica, extrapolando os limites do presente trabalho, e tendo em vista o grande potencial doador de íons apresentado pelo ProRoot® MTA, a literatura consultada, quando comparado com o CCP-ACP no vigente estudo, o MTA constitui-se como um agente mineralizador mais atrativo clinicamente, por sofrer interferências do sistema e por conseguir, além de alcalinizar o meio (vale ressaltar que os produtos bacterianos tem caráter ácido), servir de matriz estrutural e reservatório de íons para o processo de remineralização, gerando não apenas em si, mas no conjunto colagénio, túbulos dentinários, apatite que sofreu desmineralização e íons de cálcio presentes, uma possibilidade de reestruturação.



## CONCLUSÃO

A compreensão do comportamento do substrato dentinário aos processos de desmineralização e remineralização é condicionada ao entendimento do papel do colagénio na regulação da biomineralização. Justamente por constituir-se como o componente orgânico mais expressivo dos meios extracelulares, o colagénio relaciona-se com as fases inorgânicas diretamente, assim como apresenta um papel ativo na nucleação e crescimento interfibrilhar dos cristais de hidroxiapatite.

Os resultados apresentados neste trabalho são capazes de sugerir esta atividade reguladora das fibras colagénicas, ao compararem-se os padrões de mineralização apresentados pelas amostras na presença da proteína. Estas apresentaram padrões estruturados de mineralização *in vitro*, ou pelo menos uma tendência do mineral de se organizar, quando comparadas com os grupos controlo na ausência de colagénio.

Além disto, pode-se perceber uma formação similar à apatite para os grupos contendo CCP-ACP e MTA, que está de acordo com a literatura consultada frente ao potencial mineralizante destes agentes. Entretanto, como pode ser percebido pela diferença apresentada por estes agentes remineralizantes em soluções contendo colagénio e carentes de cálcio, o MTA apresentou um padrão de mineralização mais organizado quando comparado ao CCP-ACP, que sugeria uma tendência à formação de apatite. Desta maneira, e sabendo-se que para a formação mineral o sistema depende de cálcio livre, o potencial de dissolução do MTA torna-o um reservatório de iões mais atraente do que o CCP-ACP previamente estabilizado para o sistema proposto. Todavia mais estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão do processo.

Vale salientar ainda o potencial formador de apatite na ausência dos agentes remineralizantes. Embora não tenha apresentado imagem compatível com hidroxiapatite, a amostra do Grupo A à temperatura de 25°C obteve os melhores índices para a proporção de Ca/P de todos os grupos, similar à apresentada para a hidroxiapatite estequiométrica de 1,67. Porém, este resultado não confirma a presença do cristal, mas este potencial deve ser explorado em trabalhos futuros.

Devido às limitações deste estudo, principalmente relacionada à análise elementar realizada, outros trabalhos devem ser conduzidos, explorando o potencial mineralizador do colagénio como foi apresentado. Nos futuros trabalhos, técnicas mais aprimoradas para a caracterização dos sólidos devem ser realizadas, como por exemplo FTIR.





## BIBLIOGRAFIA

- Beniash, E, Traub, W., Veis, A., & Weiner, S. (2001). A Transmission Electron Microscope Study Using Vitrified Ice Sections of Predentin : Structural Changes in the Dentin Collagenous Matrix prior to Mineralization, *225*(2000), 212–225. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4320>
- Beniash, Elia, Metzler, R. A., Lam, R. S. K., & Gilbert, P. U. P. A. (2009). Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel. *Journal of Structural Biology*, *166*(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>
- Beniash, Elia, Deshpande, A. S., Fang, P. A., Lieb, N. S., Zhang, X., & Sfeir, C. S. (2011). Possible role of DMP1 in dentin mineralization. *Journal of Structural Biology*, *174*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.013>
- Bensted, J. (1976). Uses of Raman Spectroscopy in Cement Chemistry, *59*(3), 140–143.
- Boskey, A. L. (1998). Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, *30–31*, 83–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893259>
- Boskey, A. (2007). of Bones and Teeth. *Pbsb.Med.Cornell.Edu*, 385–392. Retrieved from [http://pbsb.med.cornell.edu/pdfs/Elements\\_V3n6\\_Boskey\\_v1.pdf](http://pbsb.med.cornell.edu/pdfs/Elements_V3n6_Boskey_v1.pdf)
- Bradt, J. H., Mertig, M., Teresiak, A., & Pompe, W. (1999). Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation. *Chemistry of Materials*, *11*(10), 2694–2701. <https://doi.org/10.1021/cm991002p>
- Bruyn, T. P. F. and P. L. de. (1981). The Ostwald Rule of Stages in Precipitation from Highly Supersaturated Solutions : A Model and Its Application to the Formation of the Nonstoichiometric Amorphous Calcium Phosphate Precursor Phase, (1).
- Camilleri, J. (2008). Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, *41*(5), 408–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01370.x>
- Cao, Y., Song, M., Kim, E., Shon, W., Chugal, N., Bogen, G., ... Kang, M. K. (2015). Pulp-dentin regeneration: Current state and future prospects. *Journal of Dental Research*, *94*(11), 1544–1551. <https://doi.org/10.1177/0022034515601658>
- Chapman, J. A., & Hardcastle, R. A. (1974). The staining pattern of collagen fibrils. II. A comparison with patterns computer-generated from the amino acid sequence. *Connective Tissue Research*, *2*(2), 151–159.
- Chapman, A. (1979). of Collagen, *254*(21), 10710–10714.

- CLAUDIO POGGIO, MARCO LOMBARDINI, PAOLO VIGORELLI, A. M. C. (2013). Analysis of Dentin / Enamel Remineralization by a CPP - ACP Paste : AFM and SEM Study. *Wiley Online Library*, 35(February), 366–374. <https://doi.org/10.1002/sca.21077>
- Coleman, N. J., Nicholson, J. W., & Awosanya, K. (2007). A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement, 37, 1518–1523. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2007.08.008>
- Crane, N. J., Popescu, V., Morris, M. D., Steenhuis, P., & Ignelzi, M. A. (2006). Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization, 39, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.059>
- Cui, Fu Zhai, Li, Y., & Ge, J. (2007). Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 57(1–6), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.04.001>
- Cui, F Z, Wang, Y., Cai, Q., & Zhang, W. (2008). Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate †, 3835–3840. <https://doi.org/10.1039/b805467c>
- Cutajar, A., Mallia, B., Abela, S., & Camilleri, J. (2011). Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 27(9), 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.04.012>
- Dahl, T., Sabsay, B., & Veis, A. (1998). Type I collagen-phosphoryn interactions: specificity of the monomer-monomer binding. *Journal of Structural Biology*, 123(2), 162–168. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4025>
- Damidot, D., & Nonat, A. (1994). C3S hydration in diluted and stirred suspensions: (I) study of the two kinetic steps. *Advances in Cement Research*, 6(21), 27–35. <https://doi.org/10.1680/adcr.1994.6.21.27>
- Di Foggia, M., Prati, C., Gandolfi, M. G., & Taddei, P. (2019). An in vitro study on dentin demineralization and remineralization: Collagen rearrangements and influence on the enucleated phase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193(July 2018), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.004>
- Dorozhkin, S. V. (2010). Acta Biomaterialia Amorphous calcium ( ortho ) phosphates. *Acta Biomaterialia*, 6(12), 4457–4475. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.031>

- Duarte, M. A. H., Marciano, M. A., Vivan, R. R., Tanomaru Filho, M., Tanomaru, J. M. G., & Camilleri, J. (2018). Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. *Brazilian Oral Research*, 32(suppl 1), 111–118. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0070>
- Eanes, E. D., Gillessen, I. H., & Posner, A. S. (1965). Intermediate States in the Precipitation of Hydroxyapatite. *Nature*, 208(5008), 365–367. <https://doi.org/10.1038/208365a0>
- Elnaghy, A. M., Taşlı, P. N., Aydın, S., Karapınar Kazandağ, M., Şahin, F., Margunato, S., ... Scarano, A. (2015). In Vitro Evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on Human Alveolar Bone Marrow Stem Cells in Terms of Biocompatibility and Mineralization. *Journal of Endodontics*, 41(10), 953–957. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.012>
- Feenstra, T. P., & De Bruyn, P. L. (1979). Formation of calcium phosphates in moderately supersaturated solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(4), 475–479. <https://doi.org/10.1021/j100467a010>
- Fernandes, H. R., Gaddam, A., Rebelo, A., Brazete, D., Stan, G. E., & Ferreira, J. M. F. (2018). Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Materials (Basel, Switzerland)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ma11122530>
- Forbes, W. F., & Gentleman, J. F. (1998). Risk factors, causality, and policy initiatives: the case of aluminum and mental impairment. *Experimental Gerontology*, 33(1–2), 141–154.
- Formosa, L. M., Mallia, B., Bull, T., & Camilleri, J. (2012). The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 28(5), 584–595. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.02.006>
- Frederik, P. M., & Sommerdijk, N. (2005). Spatial and temporal resolution in cryo-electron microscopy - A scope for nano-chemistry. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(5–6), 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.09.018>
- Fujisawa, R., & Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17, 1891–1903.
- Gandolfi, M. G., Silvia, F., H, P. D., Gasparotto, G., & Carlo, P. (2008). Calcium silicate coating derived from Portland cement as treatment for hypersensitive dentine. *Journal of Dentistry*, 36(8), 565–578.

- <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.03.012>
- George, A., & Veis, A. (2009). NIH Public Access, 108(11), 4670-4693. <http://doi.org/10.1021/cr0782729>. Phosphorylated
- Giovanna, M., Ciapetti, G., Taddei, P., Perut, F., Tinti, A., Vivan, M., ... Prati, C. (2010). Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dental Materials*, 26(10), 974–992. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.06.002>
- Gower, L. B. (2008). Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. *Chemical Reviews*, 108(11), 4551–4627. <https://doi.org/10.1021/cr800443h>
- He, G., & George, A. (2004). Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11649–11656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309296200>
- Johnsson, M., Richardson, C. F., Sallis, J. D., & Nancollas, G. H. (1991). Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite. *Calcified Tissue International*, 49(2), 134–137.
- Landis, W. J., M. J. Song, A. Leith, L. Mcewen, B. F. M. (1992). Mineral and Organic Matrix Interaction in Normally Calcifying Tendon Visualized in three Dimensions by High-Voltage Electron Microscopic Tomography and Graphic Image Reconstruction. *Journal of Structure Biology* 110, 1992.
- Landis, W. J., & Silver, F. H. (2002). The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 133(4), 1135–1157. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00248-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00248-9)
- Landis, W. J., Silver, F. H., & Freeman, J. W. (2006). Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues. *Journal of Materials Chemistry*, 16(16), 1495–1503. <https://doi.org/10.1039/b505706j>
- Landis, W. J., & Jacquet, R. (2013). Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcified Tissue International*, 93(4), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9725-7>
- Lausch, A. J., Quan, B. D., Miklas, J. W., & Sone, E. D. (2013). Extracellular matrix control of collagen mineralization in vitro. *Advanced Functional Materials*, 23(39), 4906–4912. <https://doi.org/10.1002/adfm.201203760>
- LeGeros, R. Z. (1991). Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monographs*

in *Oral Science*, 15, 1–201.

- Levine, M. (2011). *Topics in Dental Biochemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011 (Vol. 52). Retrieved from doi: 10.1007/978-3-540-88116-2\_1
- Liam C. Palmer, Christina J. Newcomb, Stuart R. Kaltz, Erik D. Spoerke, and S. I. S. (2009). Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel. *NIH Public Access*, 6(11), 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.07.016>. Cytokeratin
- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., & Weiner, S. (2008). Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12748–12753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803354105>
- Mahamid, J., Aichmayer, B., Shimon, E., Ziblat, R., Li, C., Siegel, S., & Paris, O. (2010). Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays, 107(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.0914218107>
- Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., & Weiner, S. (2011). Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *Journal of Structural Biology*, 174(3), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.014>
- Martínez-Ortiz, M. A., Hernández-Fuentes, A. D., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A., & Aguirre-Álvarez, G. (2015). Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: PARTIAL characterization. *CYTA - Journal of Food*, 13(2), 253–258. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.946451>
- Sarkar, N. K., R. Caicedo, P. Ritwik, R. Moiseyeva, and I. K. (2005). Application note: *Journal of Endodontics - Volume 31, Number 2, February 2005*, 31(2), 97–100. <https://doi.org/10.2172/1096475>
- Nagano, M., Nakamura, T., Kokubo, T., Tanahashi, M., & Ogawa, M. (1996). Differences of bone bonding ability and degradation behaviour in vivo between amorphous calcium phosphate and highly crystalline hydroxyapatite coating. *Biomaterials*, 17(18), 1771–1777.
- Niu, L.-N., Jiao, K., Wang, T., Zhang, W., Camilleri, J., Bergeron, B. E., ... Tay, F. R. (2014). A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *Journal of Dentistry*, 42(5), 517–533. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.015>

- Niu, X., Fan, R., Tian, F., Guo, X., Li, P., Feng, Q., & Fan, Y. (2017). Calcium concentration dependent collagen mineralization. *Materials Science and Engineering C*, 73, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.079>
- Nonat, A., & Damidot, D. (1994). *C3S hydration in diluted and stirred suspension: (II) Properties of C-S-H precipitated during the two kinetic steps. Advances in Cement Research* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1680/adcr.1994.6.22.83>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., ... Sommerdijk, N. A. J. M. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials*, 9(12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>
- Nudelman, F., With, G. De, & Sommerdijk, N. A. J. M. (2011). Cryo-electron tomography: 3-dimensional imaging of soft matter, *m*, 17–24. <https://doi.org/10.1039/c0sm00441c>
- Nudelman, F., Lausch, A. J., Sommerdijk, N. A. J. M., & Sone, E. D. (2013). In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*, 183(2), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.003>
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., ... Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R: Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- Orgel, J. P. R. O., Irving, T. C., Miller, A., & Wess, T. J. (2006). Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9001–9005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502718103>
- Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D., & Stupp, S. I. (2008). Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel. *Chemical Reviews*, 108(11), 4754–4783. <https://doi.org/10.1021/cr8004422>
- Petruska, J. A., & Hodge, A. J. (1964). a Subunit Model for the Tropocollagen Macromolecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(5), 871–876. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.871>
- Qiu, Z. Y., Cui, Y., Tao, C. S., Zhang, Z. Q., Tang, P. F., Mao, K. Y., ... Cui, F. Z. (2015). Mineralized collagen: Rationale, current status, and clinical applications. *Materials*, 8(8), 4733–4750. <https://doi.org/10.3390/ma8084733>
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., & Glimcher, M. J. (2009). Erratum to: Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis International*, 20(12),

2155–2155. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1063-2>

- Robinson, R. A., & Watson, M. L. (1952). Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. *The Anatomical Record*, 114(3), 383–409. <https://doi.org/10.1002/ar.1091140302>
- Silver, F. H., & Landis, W. J. (2011). Deposition of apatite in mineralizing vertebrate extracellular matrices: A model of possible nucleation sites on type I collagen. *Connective Tissue Research*, 52(3), 242–254. <https://doi.org/10.3109/03008207.2010.551567>
- Tadic, D., Peters, F., & Epple, M. (2002). Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials*, 23(12), 2553–2559.
- Tay, F. R., Pashley, D. H., Rueggeberg, F. A., Loushine, R. J., & Weller, R. N. (2007). Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *Journal of Endodontics*, 33(11), 1347–1351. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.008>
- Tejeda-Montes, E., Shuturminska, K., Barbieri, E., Rice, A., Pugno, N. M., Elsharkawy, S., ... Rodriguez-Cabello, J. C. (2018). Protein disorder–order interplay to guide the growth of hierarchical mineralized structures. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04319-0>
- Termine, J. D., & Posner, A. S. (1966). Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions. *Science*, 153(3743), 1523 LP – 1525. <https://doi.org/10.1126/science.153.3743.1523>
- Tomoaia, G., & Pasca, R.-D. (2015). On the Collagen Mineralization. A Review. *Medicine and Pharmacy Reports*, 88(1), 15–22. <https://doi.org/10.15386/cjmed-359>
- Toroian, D., Lim, J. E., & Price, P. A. (2007). The size exclusion characteristics of type I collagen: implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22437–22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700591200>
- Traub, W., Arad, T., & Weiner, S. (1989). Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9822–9826. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9822>
- Verdelis, K., Lukashova, L., Wright, J. T., Mendelsohn, R., Peterson, M. G. E., Doty, S., & Boskey, A. L. (2007). Maturation changes in dentin mineral properties.

- Bone*, 40(5), 1399–1407. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.12.061>
- Wang, L., & Nancollas, G. H. (2010). Dynamics of Biomineralization and Biodemineralization. *Metal Ions in Life Sciences*, 4, 413–456.
- Wang, Y., Azais, T., Robin, M., Vallée, A., Catania, C., Legriel, P., ... Nassif, N. (2012). The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials*, 11(8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>
- Weiner, S., & Traub, W. (1992). Bone structure: from angstroms to microns. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(3), 879–885.
- Wuthier, R. E., Rice, G. S., Wallace, J. E. J., Weaver, R. L., LeGeros, R. Z., & Eanes, E. D. (1985). In vitro precipitation of calcium phosphate under intracellular conditions: formation of brushite from an amorphous precursor in the absence of ATP. *Calcified Tissue International*, 37(4), 401–410.
- Yamauchi, M., Katz, E. P., Otsubo, K., Teraoka, K., & Mechanic, G. L. (1989). Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. *Connective Tissue Research*, 21(1–4), 159.
- Young, A., Mudera, V., Coathup, M., Strange, A., Abou Neel, E., Ibrahim, S., ... Aljabo, A. (2016). Demineralization&ndash;remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/ijn.s107624>
- Yuan, H., Li, Y., de Bruijn, J. D., de Groot, K., & Zhang, X. (2000). Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials*, 21(12), 1283–1290.
- Zhao, J., Liu, Y., Sun, W. Bin, & Yang, X. (2012). First detection, characterization, and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *Journal of Dental Sciences*, 7(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2012.09.001>
- Zhu, S., Yuan, Q., Yin, T., You, J., Gu, Z., Xiong, S., & Hu, Y. (2018). Self-assembly of collagen-based biomaterials: Preparation, characterizations and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(18), 2650–2676. <https://doi.org/10.1039/c7tb02999c>



## Anexos

1 – Permissão concedida pela Springer Nature® para a utilização da figura , página.

16/06/2019

RightLink Printable License

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 16, 2019

This Agreement between Mr. Gustavo Araujo ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4610680279160
License date	Jun 16, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Calcified Tissue International
Licensed Content Title	Association of Calcium and Phosphate Ions with Collagen in the Mineralization of Vertebrate Tissues
Licensed Content Author	William J. Landis, Robin Jacquet
Licensed Content Date	Jan 1, 2013
Licensed Content Volume	93
Licensed Content Issue	4
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	01
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Mineralização Dentinária in vitro
Institution name	Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz
Expected presentation date	Jul 2019
Portions	Figure 01, page 330
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Mr. Gustavo Araujo Avenida Joao Paulo II, 28 Ap 1dr  Sesimbra, Setubal 1970078 Portugal Attn: Mr. Gustavo Araujo
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

2 – Permissão de utilização de imagem concedida pela Frontiers in Bioscience® para a utilização da Figura 3.

• Fw: Commercial Use Form Form submitted on Frontiers in Bioscience

Yahoo/ Cx. de e... ★



• **FBS** <[fbs@bioscience.org](mailto:fbs@bioscience.org)>  
Para: [drusaraujo@yahoo.com](mailto:drusaraujo@yahoo.com)



14/06 às 18:45 ★

Dear Dr Araujo

Thank you for your letter. Your use is educational There is no need for a license as long as you place the reference in the figure legend and reference list.

Cordially

Heidi  
Frontiers in Bioscience  
E-mail: [fbs@bioscience.org](mailto:fbs@bioscience.org)